

**Qualitative und quantitative Untersuchungen
über die Vermehrung von Borna-Virus
in Zellkulturen**

Dieter Heubeck

1976

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
des Fachbereichs Tiermedizin der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. A. Mayr

QUALITATIVE UND QUANTITATIVE UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DIE VERMEHRUNG VON BORNA-VIRUS
IN ZELLKULTUREN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Dieter Heubeck
aus
Erlangen

München 1976



Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. B. Vollmerhaus
Referent:	Prof. Dr. Dr.h.c. A. Mayr
Korreferent:	Prof. Dr. J. von Sandersleben
Tag der Promotion:	27. Februar 1976

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
1. <u>EINLEITUNG</u>	1
2. <u>SCHRIFTTUM</u>	2
2.1 <u>Allgemeines zur persistenten Virus- infektion</u>	3
2.2 <u>Methoden zum Nachweis persistenter Virusinfektionen in vitro</u>	5
2.2.1 Allgemeines	5
2.2.2 Nachweis von virusbedingten Zellver- änderungen	5
2.2.2.1 Lichtmikroskopischer Nachweis morphologischer Zellveränderungen	5
2.2.2.1.1 Allgemeines	5
2.2.2.1.2 Einschlußkörperchenbildung	6
2.2.2.1.3 Synzytien- und Riesenzellbildung	8
2.2.2.1.4 Kernveränderungen	9
2.2.2.2 Ultrahistologischer Nachweis morphologischer Zellveränderungen	9
2.2.2.3 Physikalisch-chemischer Nachweis von Dichteveränderungen	10
2.2.2.4 Analysierung virusbedingter Zell- veränderungen im UV-Raster-Mikroskop	10
2.2.2.5 Nachweis biologisch erfaßbarer Zellveränderungen	11
2.2.2.5.1 Änderungen der Wachstumsrate persistent infizierter Zellen	11
2.2.2.5.2 Verhalten persistent infizierter Zellen bei Doppelinfektionen	12

2.2.3	Nachweis von Viruskomponenten	14
2.2.3.1	Nachweis von Virus-Nukleinsäure	14
2.2.3.1.1	Identifizierung nach Acridinorange-Färbung	14
2.2.3.1.2	Bestimmung durch Autoradiographie	14
2.2.3.1.3	Bestimmung durch Gel-Elektrophorese	16
2.2.3.2	Nachweis von Virus-Protein	17
2.2.3.2.1	Bestimmung durch Gel-Elektrophorese	17
2.2.3.3	Nachweis von Virusstrukturen	18
2.2.3.3.1	Ultrahistologischer Nachweis	18
2.2.4	Nachweis von virusinduziertem Antigen	19
2.2.4.1	Lokalisierter Antigennachweis	19
2.2.4.1.1	Immunofluoreszenz-Technik	19
2.2.4.1.2	Immunoperoxidase-Technik	22
2.2.4.1.3	Immunoferritin-Technik	22
2.2.4.1.4	Hämadsorption und Hämadsorptions-hemmung	22
2.2.4.2	Nachweis von freigesetztem Antigen	23
2.2.4.2.1	Komplementbindungsreaktion	23
2.2.4.2.2	Präzipitation	24
2.2.4.2.3	Hämagglutination	25
2.2.5	Nachweis von infektiösem Virus	26
2.2.5.1	Nachweis von infektiösem Virus im Versuchstier	26
2.2.5.2	Nachweis von infektiösem Virus im Hühnerei	27
2.2.5.3	Nachweis von infektiösem Virus in Zellkulturen	27
2.3.	<u>Methoden zur Aktivierung persistenter Virusinfektionen in vitro</u>	28
2.3.1	Allgemeines	

2.3.2	Exogene Zufuhr von Antimetaboliten	29
2.3.2.1	Halogenierte Desoxyuridine	30
2.3.2.2	Actinomycin D	31
2.3.3	Änderung der Milieufaktoren	31
2.3.3.1	Ernährung der Wirtszellen	32
2.3.3.2	Züchtungstemperatur	32
2.3.3.3	Zahl der Viruspassagen	32
2.3.4	Schaffung geeigneter Zellkultursysteme	33
2.3.4.1	Wechsel auf andere Zellart	33
2.3.4.2	Co-Kultivierung	34
2.3.4.3	Zellfusion	34
2.3.5	Doppelinfektion	35
2.4	<u>Methoden zur Gewinnung von infektiösem Virus aus persistent infizierten Zellkulturen</u>	37
2.4.1	Allgemeines	37
2.4.2	Zellaufschlußverfahren	37
2.4.3	Extraktionsverfahren	38
2.4.4	Verwendung von speziellen Virus-Stabilisatoren	38
3.	<u>EIGENE UNTERSUCHUNGEN</u>	40
3.1	<u>Material und Methoden</u>	40
3.1.1	Virusmaterial	40
3.1.2	Versuchstiere	41
3.1.3	Zellkulturen	41
3.1.3.1	Anlage der Primärkulturen	41
3.1.3.2	Verwendete Zell-Linien	45
3.1.3.3	Haltung und Vermehrung der Zellkulturen	45

3.1.4	Immunofluoreszenz	47
3.1.4.1	Immunseren	47
3.1.4.2	Konjugatherstellung	47
3.1.4.3	Färbung der Zellkulturen zur fluoreszenzserologischen Auswertung	48
3.1.4.4	Optische Ausrüstung	48
3.1.4.5	Fluoreszenzserologische Auswertung	48
3.1.5	Virustitration	49
3.1.6	Bei der Virusgewinnung verwendete Lösungen	49
3.2	<u>Versuche und Ergebnisse</u>	51
3.2.1	Empfänglichkeit verschiedener Zellkulturen für Borna-Virus	51
3.2.2	Eignung einiger Zellarten für den quantitativen Nachweis von Borna- Virus	54
3.2.3	Vergleich der Empfindlichkeit von Kaninchen und Zellkulturen für Borna-Virus	60
3.2.4	Titration von Borna-Virus in Zellkulturen	61
3.2.4.1	Auftreten und zeitliche Entwick- lung von fluoreszierenden Zentren	62
3.2.4.2	Einfluß des Alters von Zellkulturen auf das Titrationsergebnis	63
3.2.4.3	Einfluß der Infizierungstechnik auf das Titrationsergebnis	66
3.2.5	Ausbreitung und Vermehrung von Borna-Virus in Zellkulturen	71
3.2.5.1	Ausbreitung und Vermehrung von Borna-Virus in CV ₁ -Zellen	72
3.2.5.2	Ausbreitung und Vermehrung von Borna-Virus in BKG-Zellen	73
3.2.5.3	Ausbreitung und Vermehrung von Borna-Virus in FLG-Zellen	76

3.2.6	Eignung verschiedener Zellkulturen für die Produktion von Borna-Virus	79
3.2.7	Verfahren zur Gewinnung von Borna- Virus aus permanent infizierten Zellkulturen	86
3.2.7.1	Zellaufschluß durch Ultraschall- behandlung	87
3.2.7.2	Zellaufschluß durch Gefrier-Tauen	87
3.2.7.3	Zellaufschluß in verschiedenen Medien	88
3.2.7.4	Zellaufschluß durch Aqua dest.-Be- handlung	88
3.2.7.5	Zellaufschluß durch Saline-Behand- lung	89
3.2.7.6	Virusextraktion mit Glycin-Puffer	89
4.	<u>BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE</u>	92
5.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	99
6.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	103



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553812_0024

1.

E I N L E I T U N G

Bis vor wenigen Jahren war die Erforschung des Borna-Virus und der Bornaschen Krankheit dadurch erschwert, daß der Erreger nicht im Laboratorium gehandhabt werden konnte. Mit der erfolgreichen Züchtung des Virus in Zellkulturen durch MAYR und DANNER (1972) hat sich das Bild gewandelt. Waren es zunächst Lammnieren-Zellen, in denen Borna-Virus zur Vermehrung gebracht werden konnte, erwies sich in der folgenden Zeit auch die Sensibilität anderer Zellarten (MAYR und DANNER, 1972; 1974; LUDWIG und Mitarb., 1973). Der Virusnachweis geschieht relativ einfach mit der Immunofluoreszenz-Technik (DANNER und MAYR, 1973), die in ersten Untersuchungen auch für Virustitrationen geeignet war (MAYR und DANNER, 1974b).

Borna-Virus bildet in Zellkulturen eine persistente Infektion aus (MAYR und DANNER, 1974a). Persistente Virus-Zell-Systeme lassen sich erfahrungsgemäß sehr schwer erfassen. Daher war es besonders wichtig, die Grundkenntnisse über das Verhalten des Borna-Virus in Zellkulturen zu erweitern. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation war es zunächst wesentlich, verschiedene Arten von Zellkulturen bezüglich ihrer Eignung für Nachweis und Produktion des Virus zu untersuchen. Qualitative und quantitative Unterschiede zwischen den einzelnen Systemen mußten aufgezeigt und ausgewertet werden; das Verfahren der Virustitration war zu standardisieren und die Möglichkeit einer maximalen Virusgewinnung zu eruieren.

Durch die Untersuchungen sollten letztlich die Routineverfahren für die Laboratoriumsarbeit mit dem Borna-Virus erarbeitet werden, ohne die weder eine Viruscharakterisierung noch die Aufklärung pathogenetischer und immunologischer Vorgänge bei der Bornaschen Erkrankung möglich sind.

2. S C H R I F T T U M

2.1 ALLGEMEINES ZUR PERSISTENTEN VIRUSINFEKTION

Abhängig von Virusart und Zellsystem gibt es vielerlei Ausdrucksformen des Virus-Zell-Verhältnisses. Früher wurde meist derjenige Infektionsverlauf als typisch angesehen, bei dem die infizierte Zelle massiv Virus vermehrte und dabei selbst zugrunde ging (lytische Infektion). Mehr und mehr kennt man heute aber Virusinfektionen, bei denen die befallenen Zellen nicht zerstört werden. Bei derartigen nicht lytischen Infektionen müssen wir unterscheiden zwischen solchen Fällen, in denen Virus nach einer relativ kurzen Zeit von der Zelle eliminiert wird (transiente Infektion), und anderen Fällen, in denen sich eine langfristige Virus-Zell-Beziehung ausbildet. Je nach ihren Erscheinungsformen werden solche p e r s i s t e n t e n I n f e k t i o n e n als latent, toleriert oder okkult bezeichnet:

1. Latente Virusinfektion

In latent infizierten Zellen werden nur geringe Mengen Virus gebildet, da zelluläre Mechanismen eine größere Virusvermehrung unterdrücken; z.B. bei einer persistenten Mumps-Virusinfektion (WALKER und HINZE, 1962).

2. Tolerierte Virusinfektion

Über einen langen Zeitraum bestehen Zell- und Virusvermehrung scheinbar unbeeinflusst in einem System nebeneinander; z.B. bei Schweinepest-Virusinfektion (MAHNEL und MAYR, 1974).

3. Okkulte (maskierte) Virusinfektion

In infizierten Zellen ist kein vollständiges Virus vorhanden, sondern nur eine Vorstufe; häufig sind Teile des Virusgenoms ins Zellgenom integriert; z.B. bei Epstein-Barr-Virusinfektion (ZUR HAUSEN und SCHULTE-HOLTHAUSEN, 1970).

In vivo sind all diesen Infektionsformen unterschiedliche pathogenetische und immunogenetische Mechanismen zugeordnet. In vitro tritt dagegen das Gemeinschaftliche besonders deutlich zutage:

1. Den persistenten Virusinfektionen fehlen im allgemeinen die morphologischen Zellveränderungen, an denen man üblicherweise eine Virusinfektion erkennt.
2. Meist wird Virus nur in geringer Menge synthetisiert; oft kommt es nur zur Bildung einzelner Virusantigene.
3. Häufig wird Virus zwar gebildet, aber von der Zelle nicht freigesetzt.

Für die Arbeit im Laboratorium ist es daher ganz besonders wichtig, mit welchen Methoden man persistente Virusinfektionen nachweisen kann. Häufig gelingt das erst durch vorhergehende Aktivierung der Infektion. Schließlich bringt man auch der Technik der schonenden Virusgewinnung großes Interesse entgegen. Unter diesen Gesichtspunkten wurden im folgenden die Virus-Zell-Systeme besprochen, bei denen Virus in vitro persistiert.

In vitro-Persistenz ist nicht ausschließlich an Virusarten gebunden, die auch in vivo typische persistente Infektionen hervorrufen, wie z.B. das Virus der lymphozytären Chorio-meningitis, Masern-Virus oder Tollwut-Virus (HOTCHIN, 1971), sondern kann in entsprechenden Zell-Systemen auch bei den

sonst typisch lytischen Virusarten, wie z.B. Polio-Virus und dem Virus der Maul- und Klauenseuche (WALKER, 1964), beobachtet werden.

2.2 METHODEN ZUM NACHWEIS PERSISTENTER VIRUSINFEKTIONEN IN VITRO

2.2.1 Allgemeines

MAYR und Mitarb. (1974) unterteilten die Arten der Virusvermehrung in Zellkulturen in:

1. Virusvermehrung mit cytopathischem Effekt,
2. Virusvermehrung mit proliferativem Effekt,
3. Virusvermehrung ohne morphologische Veränderungen.

Unter Ausklammerung der Virusvermehrung mit lytisch-cytopathischem Effekt kann diese Einteilung auch auf persistierende Virusarten angewandt werden.

Die persistente Virusinfektion läßt sich also entweder durch nicht lytische Zellveränderungen oder über den Nachweis von Virusstrukturen, Antigen oder infektiösem Virus erkennen.

2.2.2 Nachweis von virusbedingten Zellveränderungen

2.2.2.1 Lichtmikroskopischer Nachweis morphologischer Zellveränderungen

2.2.2.1.1 Allgemeines

Eine lichtmikroskopisch sichtbare, morphologische Veränderung von empfänglichen, virusinfizierten Zellen wird als c y t o p a t h i s c h e r E f f e k t (cpE) bezeichnet (MAYR und Mitarb., 1974). Dabei lassen sich folgende verschiedene Formen des cpE unterscheiden:

- Zytolyse,
- Abkugelung,
- granuläre Degeneration,
- vakuolisierende Degeneration,
- schollige Degeneration,
- Einschlußkörperchenbildung,
- Synzytien- und Riesenzellbildung,
- Kernveränderungen.

Abkugelung, granuläre, vakuolisierende und schollige Degeneration sind Effekte zytolytischer Viren; oftmals gehen sie ineinander über und führen letztlich zur Zytolyse. Einschlußkörperchenbildung, Synzytien- und Riesenzellbildung sowie Kernveränderungen sind Effekte, die auch von persistierenden Viren bewirkt werden können und deshalb für deren Nachweis von Bedeutung sind. Oft ist es notwendig, zur Sichtbarmachung cytopathischer Veränderungen die infizierten Kulturen mit den in der Histologie üblichen Verfahren anzufärben.

2.2.2.1.2 Einschlußkörperchenbildung

Als Einschlußkörperchen bezeichnet man basophile oder eosinophile, homogene, manchmal gramulierte, von der Umgebung gut abgegrenzte und mit dem Lichtmikroskop nach Färbung sichtbare, zellfremde Ansammlungen im Zellkern oder im Zytoplasma (MAYR und Mitarb., 1974).

In Tabelle 1 ist das Vorkommen von Einschlußkörperchen bei den wichtigsten persistierenden Virusspecies aufgeführt.

LOKALISATION	NUKLEINSÄURE	VIRUSGRUPPE	VIRUSSPECIES	LITERATUR
<u>KERN</u>	DNS	Parvovirus	Panleukopenie-V.	88; 118
	DNS	Herpesvirus	Marek Disease-V.	28; 52; 139
			Borna-V.	40; 124; 125
<u>ZYTOPLASMA</u>	DNS	Iridovirus(?)	V. der Afrikanischen Schweinepest	63; 137; 169
	RNS	Reovirus	Reo-V.	9; 54
	RNS	Paramyxovirus	Mumps-V.	54
	RNS	Rhabdovirus	Tollwut-V.	54; 108
	RNS	Arenavirus	V. der lymphozytären Choriomeningitis	2
<u>KERN und ZYTOPLASMA</u>			Lassa-V.	24
			Junin-, Machupo-V.	134; 157
	DNS	Herpesvirus	Cytomegalie-V.	54; 129
	RNS	Paramyxovirus	Parainfluenza-V.	128
			Masern-V.	54

Tabelle 1: Vorkommen von Einschlußkörperchen bei den wichtigsten persistierenden Virusspecies

2.2.2.1.3 Synzytien- und Riesenzellbildung

Unter Synzytien- und Riesenzellbildung versteht man eine Masse von Zytoplasma, die viele Zellkerne enthält (MAYR und Mitarb., 1974).

1. Synzytien entstehen durch Zellverschmelzung aus einkernigen Zellen und können bis zu 1000 Kerne akkumulieren.
2. Echte Riesenzellen entstehen durch Kernteilung, sind sternförmig und wesentlich kleiner als Synzytien; meist enthalten sie nur 3-5 Kerne.

Synzytien und Riesenzellen können nach Infektion von Zellkulturen mit folgenden persistierenden Viren gebildet werden:

HERPESVIRUS

- Cytomegalie-Virus (McALLISTER und Mitarb., 1967)
- Marek Disease-Virus (PURCHASE und Mitarb., 1971)

PARAMYXOVIRUS

- Parainfluenza-Virus (FENNER und WHITE, 1971)
- Masern-Virus (ENDERS und PEEBLES, 1954;
SELIGMAN und RAPP, 1959;
ROIZMAN und SCHLUEDERBERG, 1962)
- Mumps-Virus (HENLE und Mitarb., 1954)

TOGAVIRUS (?)

- Lactat-Dehydrogenase-Virus (FRANTSI und GREGORY, 1968;
Maus) STAUBER, 1971)

NICHT KLASSIFIZIERT

- Visna- u. Maedi-Virus (SIGURDSSON und Mitarb., 1960;
HARTER und CHOPPIN, 1967a/b;
BUNGE und HARTE, 1969)

2.2.2.1.4 Kernveränderungen

Morphologische Veränderungen des Zellkernes lassen sich nach MAYR und Mitarb. (1974) unterteilen in:

- Kernwandhyperchromasie,
- Vergrößerung der Nukleoli,
- Schwellung der Kernmembran,
- Vergrößerung des Zellkernes,
- Schrumpfung des Zellkernes.

SEAMER (1974) beobachtete undeutliche Zellkernveränderungen in Mäusegehirn-Kulturen, die mit Semliki Forest-Virus infiziert wurden; in gefärbten Präparaten hoben sich zwischen dem 1.(2.) und 7. Tag p.inf. eine Vielzahl pyknotischer Zellkerne hervor, denen kein oder nur wenig Zytoplasma anhaftete. MAYR und DANNER (1972b) berichteten von Kernvergrößerung und -vakuolisierung bei einer Borna-Virusinfektion in Lammnieren-Zellen.

2.2.2.2 Ultrahistologischer Nachweis morphologischer Zellveränderungen

Im Elektronenmikroskop kann z.B. die Struktur von Zelleinschlüssen und deren Beziehung zu Zellbestandteilen dargestellt werden.

COTO und DE VOMBERGAR (1969) fanden bei ultrahistologischen Untersuchungen an Junín-Virus-infizierten Vero-Zellen multi-membranöse zytoplasmatische Veränderungen, bestehend aus mehreren konzentrischen Strukturen, die granulären, ribosomalen Elementen ähnelten, und daneben amorphes Material. ABELSON und Mitarb. (1969) berichteten von großen ribosomalen Aggregaten im Zytoplasma LCM-Virus-infizierter 3T3-Mäusezellen.

In den typischen zytoplasmatischen Einschlüssen, die bei REO-Virusinfektionen auftreten, können ultrahistologisch große kristalline Virion-Aggregate dargestellt werden (FENNER und WHITE, 1971).

2.2.2.3 Physikalisch-chemischer Nachweis von Dichteveränderungen persistent infizierter Zellen

Angeregt durch das Phänomen der Synzytienbildung bei Infektionen mit Herpesviren beobachteten ROSS und ASH (1974) mit Hilfe eines linearen Dichtegradienten und Spektral-Photometrie Dichteveränderungen bei Zellen, die mit Herpes simplex-Virus infiziert wurden, im Gegensatz zu nicht-infizierten Kontrollzellen. Ähnliche Ergebnisse erzielten BALL und MEDZON (1973) mit L-Zellen im Frühstadium einer Vaccinia-Virusinfektion.

2.2.2.4 Analysierung virusbedingter Zellveränderungen im UV-Raster-Mikroskop

Durch die Möglichkeit, mit Hilfe der Computer-Technik minimale Zellveränderungen zu analysieren, gelangten TER MEULEN und Mitarb. (1972b) zu einem neuen Nachweisverfahren für persistent infizierte Zellkulturen. Bei persistent mit Moloney Leukämie-Virus infizierten Zellen, die keinerlei morphologische und zytochemische Abweichungen von nicht-infizierten zeigten, wurden die Absorptionsraten von UV-Licht in einem UV-Raster-Mikroskop gemessen und die erhaltenen mikrophotometrischen Werte mit denen nicht-infizierter Kontrollzellen Computer-technisch verglichen. Damit konnten selbst minimale

Unterschiede in Vorkommen und Verteilung von Nukleinsäuren, bis zu einem gewissen Grad auch von Proteinen und Viruspartikeln, dargestellt und zum Nachweis einer Virusinfektion verwendet werden.

2.2.2.5 Nachweis biologisch erfaßbarer Zellveränderungen

2.2.2.5.1 Änderungen der Wachstumsrate persistent infizierter Zellen

Einige persistierende Viren beeinflussen den Stoffwechsel ihrer Wirtszellen dahingehend, daß sich die Wachstumsraten in den infizierten Kulturen merkbar verändern; je nach Virus und Zellart kann es dabei von deutlicher Hemmung der Zellvermehrung bis zu exzessiver Proliferation kommen.

1. Verminderung der Wachstumsrate

MAGUIRE und MILES (1965) fanden bei Arbo-Virus-infizierten Zellen zwar keine morphologischen Veränderungen, ihre Wachstumsrate war jedoch auffallend vermindert. Entsprechende Beobachtungen machten BEASLEY und Mitarb. (1960) bei HeLa-Zellen nach Infektion mit Dengue 2-Virus, wobei die Wachstumsrate vergleichsweise um ein Drittel bis zur Hälfte herabgesetzt war. Sie erklärten sich dieses Phänomen durch Veränderungen im Metabolismus der infizierten Zellen aufgrund kontinuierlicher Interferon-Einflüsse.

2. Erhöhung der Wachstumsrate

Als proliferativer Effekt kann der Verlust der Kontakthemmung und die Zellgruppenbildung angesehen werden,

wie sie von WEBB und Mitarb. (1971) bei der Züchtung von attenuierten Masern-Virusstämmen in menschlichen foetalen Gehirnzellen beobachtet wurden. Ähnliche Ergebnisse liegen hinsichtlich West Nil-, Kyasanur Forest Disease- und Langat-Virus vor (ILLAVIA und WEBB, 1972). Versuche mit Mäuse- und Schafgehirnzellen bei einer Infektion mit Scrapie-Agens ergaben ebenfalls ein erhöhtes Wachstumspotential der Kulturen (FIELD und WINDSOR, 1965; GUSTAFSON und KANITZ, 1965; HAIG und PATTISON, 1967).

Bei einer persistenten Infektion mit Chikungunya-Virus in Mäusegehirnzellen entwickelten die Kulturen innerhalb von zwei Tagen p.inf. Zonen mit epithelartigem Wachstum und verloren stellenweise die Kontakthemmung, was zu Überlappungen und Zellhaufenbildung führte (PRECIOUS und Mitarb., 1974).

2.2.2.5.2 Verhalten persistent infizierter Zellen bei Doppelinfektion

Einige persistierende Viren können durch Phänomene, die bei Doppelinfektion auftreten, nachgewiesen werden:

1. Interferenz

Darunter versteht man den Effekt, daß die bereits mit einem Virus infizierte Zelle gegenüber Superinfektion mit einer zweiten Virusart unempfindlich ist.

2. Helfer-Effekt

Hierbei wird die schwache Vermehrung eines Virus durch gleichzeitige Vermehrung einer zweiten Virusart verstärkt.

Mit Hilfe der Interferenz konnte Rubella-Virus erstmals in Zellkulturen nachgewiesen werden:

ECHO-Virus Typ 11 lysiert normalerweise Affennieren-Zellen; dieser Effekt unterblieb bei Kulturen, die bereits mit Rubella-Virus infiziert waren (VERONELLI und Mitarb., 1962; WELLER und NEVA, 1962; MCCARTHY und Mitarb., 1963; RAPP und MELNICK, 1964; SIGURDARDOTTIR und Mitarb., 1963).

Bedeutung besitzen Interferenz und Helfer-Effekt für den quantitativen Nachweis der Schweinepest-Virusinfektion in Zellkulturen. Von der großen Anzahl an Methoden, die unter Ausnützung dieser Phänomene mit den verschiedensten Virusarten beschrieben wurden (MAHNEL und MAYR, 1974), konnten sich im wesentlichen nur drei durchsetzen:

1. KUMAGAI und Mitarb. (1958) beobachteten, daß in Ferkelhodenkulturen der schwache zytopathische Effekt eines Newcastle Disease-Virus verstärkt wird, wenn die Kulturen vorher mit Schweinepest-Virus infiziert worden waren. Gleichzeitig steigt bei einer derartigen Doppelinfektion der Hämagglutiningehalt der Kultur an. Diese Phänomene wurden von den Autoren zum Nachweis des Schweinepest-Virus in Zellkulturen unter der Bezeichnung END-Methode (Exaltation of Newcastle Disease) benutzt.
2. KUBIN (1962) beschrieb einen ähnlichen Test, wobei er das Teschen-Virus als Helfer-Virus einsetzte; er bezeichnete dieses Verfahren als ETV-Methode (Exaltation of Teschen Virus).
3. Beim Interferenz-Phänomen wird durch die Infektion des Schweinepest-Virus (interferierendes Virus) ein zu erwartender zytopathischer Effekt eines heterologen, später zugesetzten Virus (Challenge-Virus) durch Interferenzvorgänge unterdrückt. Auf dieser Grundlage entwickelten NISHIMURA und Mitarb. (1962) den sog. HEIC-Test (Hemagglutination exaltation and inhibition of cytopathic effect) zum Nachweis von Schweinepest-Virus in Affennierenkulturen.

2.2.3 Nachweis von Viruskomponenten

2.2.3.1 Nachweis von Virus-Nukleinsäure

2.2.3.1.1 Identifizierung nach Acridinorange-Färbung

Die Methode wird zur Bestimmung von DNS und RNS in Einschlußkörperchen oder zur Lokalisierung bei der Vermehrung von DNS- und RNS-Viren benutzt. Dabei färben sich einsträngige RNS und DNS leuchtendrot, doppelsträngige RNS und DNS grün, wenn die Zellen unter ultravioletterm Licht im Mikroskop betrachtet werden (MAYOR, 1964).

Mit dieser Technik gelang z.B. beim Virus der Afrikanischen Schweinepest (SANCHEZ BOTIJA, 1963; HAAG und LARENAUDIE, 1965) und beim Virus der lymphozytären Choriomeningitis (BARLOW und Mitarb., 1965) der Nachweis von Virusnukleinsäure in infizierten Zellen.

2.2.3.1.2 Bestimmung durch Autoradiographie

Ein in letzter Zeit häufig angewandtes Verfahren zur Identifizierung von Nukleinsäuren, die in persistent infizierten Zellen synthetisiert werden, ist die Autoradiographie :

Ein im Medium vorhandener, speziell für die Nukleinsäure-Synthese essentieller Baustein wird durch Kopplung mit Radio-Isotopen markiert. Dadurch läßt sich sein weiterer Weg nach der Aufnahme durch die Zelle mittels Radioaktivitätsmessungen verfolgen, wobei eine vermehrt auftretende Radioaktivität gleichzeitig auf gesteigerte Nukleinsäure-Synthese schließen läßt. Als Markierungssubstanzen finden dabei vorwiegend (^3H)- oder (^{14}C)-Thymidin (für DNS-Synthese) und

(^3H)- oder (^{14}C)-Uridin (für RNS-Synthese) Verwendung.

Die Radioaktivitätsmessung kann entweder direkt, d.h. an der intakten Zelle erfolgen, um Stellen vermehrter Synthese zu lokalisieren, oder zur genaueren Differenzierung zwischen Zell- und Virus-Nukleinsäuren nach vorheriger Nukleinsäure-Extraktion und Dichte-Fraktionierung.

1. Direkte Autoradiographie

Eine persistent mit dem Virus der Afrikanischen Schweinepest infizierte Kultur wurde mit (^3H)-Thymidin beschickt, und dessen Zelleinbau anhand der in den Zellen auftretenden Radioaktivität verfolgt.

Nach den Messungen wurde in den Regionen zytoplasmatischer Einschlusskörper vermehrt Thymidin inkorporiert; damit konnten diese als Orte der Virussynthese identifiziert werden (VIGARIO und Mitarb., 1967; MOULTON und COGGINS, 1968; HESS, 1971).

2. Extrazelluläre Autoradiographie

GARFINKLE und McAUSLAN (1973) untersuchten die virale DNS-Synthese in persistent mit Herpes simplex-Virus Typ 1 und 2 infizierten Zellkulturen. Hierzu extrahierten sie die DNS aus den mit (^3H)-Thymidin inkubierten Zellen (MARMUR, 1961) und trennten sie durch Zentrifugation in einem linearen CsCl-Dichtegradienten. Bei jeder der entnommenen Fraktionen wurde eine Dichtebestimmung im Refraktometer und nach Präzipitation der DNS eine Radioaktivitätsbestimmung durch Szintillations-Spektrometrie durchgeführt. Im Gegensatz zu einem vergleichsweise getesteten permissiven Zellsystem konnte im "carrier"-System keine deutliche Virus-DNS-Synthese festgestellt werden.

Nach dem gleichen Verfahren gingen LEE und Mitarb. (1973) vor, um Eigenschaften von Marek-Virus-DNS in verschiedenen Zellsystemen zu vergleichen.

LUDWIG (1975) berichtete von einer speziellen RNS, die mittels Autoradiographie (^3H -Uridin) und Dichte-Fraktionierung (Saccharose-Dichtegradient) im Medium persistent mit Borna-Virus infizierter Affennieren-Zellkulturen nachweisbar ist.

2.2.3.1.3 Bestimmung durch Gel-Elektrophorese

Die Gel-Elektrophorese-Technik wurde bisher hauptsächlich zur Identifizierung von viralen Poly-Peptiden eingesetzt (vgl. Abschnitt 2.2.3.2). In letzter Zeit gewann dieses Verfahren aber auch für die Trennung von Nukleinsäuren verschiedener Molekulargewichte, besonders bei persistenten Virusinfektionen, große Bedeutung (AAY und BORST, 1975).

SOL und Mitarb. (1975) extrahierten die Virus-Nukleinsäure aus persistent mit SV4o-Virus infizierten Zellkulturen (HIRT, 1967) und wiesen eine defekte Virus-DNS mittels Agarose-Gel-Elektrophorese nach.

DUESBERG und VOGT (1973) verwendeten die Polyacryl-Gel-Elektrophorese zum Vergleich der viralen RNS von Geflügelsarkom- und Geflügelleukose-Virus mit anderen RNS-Species. Nach der gleichen Technik verfahren ORTIN und DOERFLER (1975) zur Identifizierung viraler mRNS bei einer abortiven Adeno-Typ-12-Virusinfektion.

2.2.3.2 Nachweis von Virus-Protein

2.2.3.2.1 Bestimmung durch Gel-Elektrophorese

Die Gel-Elektrophorese-Technik eignet sich besonders zur Bestimmung von viralen Poly-Peptiden. Dem Verfahren liegt das Prinzip zugrunde, daß dissoziierte Proteine unterschiedlichen Molekulargewichts und damit unterschiedlicher Ladungsverteilung in einem elektrischen Feld verschieden weit wandern. Die bei der Trennung entstehenden Protein-Banden lassen sich nach Färbung lokalisieren. Für die Auswertung von Bedeutung ist dabei das Phänomen, daß eine direkte Proportionalität zwischen Laufstrecke und Molekulargewicht besteht. Anhand von Vergleichsproteinen bekannten Molekulargewichts (Standards) kann so das Gewicht des getesteten Proteins aus seiner Migration berechnet werden.

Die Proteinbestimmung erfolgt am günstigsten mit gereinigten Viruspräparationen. Als Laufmedium eignet sich vor allem Polyacrylamid, sowohl für die horizontale

Platten-Gel-Elektrophorese,

als auch für die vertikale

Säulen-(Disc-)Gel-Elektrophorese

(WEBER und OSBORN, 1969).

LEWANDOWSKI und Mitarb. (1973) gelang mit Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese die Aufklärung der Protein-Struktur eines Parainfluenza(6/94)-Virus, das aus fusionierten Multiple Sklerose-Gehirnzellen isoliert wurde. Sie bestimmten neun elektrophoretisch trennbare Poly-Peptide von ca. 36 000 bis 72 000 Dalton MG. WATERS und Mitarb. (1974) untersuchten mittels Gel-Elektrophorese den Einfluß von Trypsin auf die Protein-Struktur des gleichen Virus. SPEAR und ROIZMAN (1972) verwendeten die Disc-Gel-Elektrophorese zur Identifizierung der Protein-Struktur von Herpes simplex-Virus.

2.2.3.3 Nachweis von Virus-Strukturen

2.2.3.3.1 Ultrahistologischer Nachweis

Der ultrahistologische Nachweis von Virus-Strukturen kann in Verbindung mit anderen Nachweisverfahren wichtige Aufschlüsse über die Struktur, Synthese, Lokalisation und Freisetzung persistierender Viren in Zellen geben.

Virus-Strukturen wurden ultrahistologisch u.a. bei

- LCM-Virus (ABELSON und Mitarb., 1969),
- Lassa-Virus (CASALS und BUCKLEY, 1974),
- Junin-Virus (COTO und DE VOMBERGAR, 1969),
- Masern-Virus (DUBOIS-DALCQ u. HORTA-BARBOSA, 1973;
 DUBOIS-DALCQ u. Mitarb., 1974),
- REO-Virus (RHIM und Mitarb., 1962),
- Tollwut-Virus (LOVE und Mitarb., 1964),
- Cytomegalie-Virus (McALLISTER und Mitarb., 1967),
- Marek-Virus (NAZERIAN und PURCHASE, 1970),
- Afr. Schweinepest-
 virus (SANCHEZ BOTIJA, 1963;
 BREESE und DeBOER, 1966;
 BREESE und Mitarb., 1967)

festgestellt.

Allerdings wird die Anwendungsmöglichkeit dadurch begrenzt, daß in einigen "carrier"-Systemen nur ein geringer Anteil der Zellen infiziert ist, der mit der ultrahistologischen Technik aber nicht selektiv erfaßt werden kann (WALKER, 1964).

2.2.4 Nachweis von virusinduziertem Antigen

2.2.4.1 Lokalisierter Antigennachweis

Bei den meisten persistenten Virusinfektionen werden zellgebundene Antigene synthetisiert, die mittels entsprechender Verfahren in den intakten Zellen direkt nachweisbar sind. Zum Nachweis werden die

Immunofluoreszenz - Technik,
Immunoperoxidase - Technik,
Immunoferritin - Technik und
HämadSORption

verwendet.

2.2.4.1.1 Immunofluoreszenz-Technik

Der Nachweis von Antigen mittels direkter oder indirekter Immunofluoreszenz (IFT) ist derzeit bei den meisten Infektionen mit persistierenden Virusarten in Zellkulturen die Methode der Wahl (Zusammenstellung siehe Tabelle 2). Der Anwendung der IFT kommt die Tatsache entgegen, daß es bei vielen persistierenden Viren wie

dem Virus der lymphozytären Choriomeningitis,
dem Virus der Aleutenkrankheit der Nerze,
dem Virus der Afrikanischen Schweinepest,
dem Virus der infektiösen Anämie der Einhufer,
Lactat-Dehydrogenase-Virus,
Junín-, Machupo-Virus und
Scrapie-Agens

in vivo zwar zur Bildung nur geringer Mengen an neutrali-

sierenden Antikörpern kommt, dagegen jedoch die Produktion "fluoreszierender" Antikörper in vielen Fällen gesteigert ist (HOTCHIN, 1971).

Die IFT ermöglicht einen spezifischen Antigennachweis in der Zelle und kann auch für quantitative Untersuchungen verwendet werden, wie dies zum ersten Mal von RAPP und Mitarb. (1959) für das Masern-Virus und in neuester Zeit für LCM-Virus (WEBSTER und KIRK, 1974) beschrieben worden ist. Daneben erlaubt sie einen Überblick über die Lokalisation von Antigen in der Einzelzelle, wobei sich in einigen Fällen, z.B. bei LCM-Virus (BARLOW und Mitarb., 1965), ASP-Virus (HEUSCHELE und Mitarb., 1966), Marek-Virus (PURCHASE, 1969; NAZERIAN und PURCHASE, 1970) und Borna-Virus (DANNER und MAYR, 1973) Übereinstimmung mit der Lokalisation von Einschlußkörperchen findet.

Mit der IFT läßt sich der Infektionsverlauf somit zeitlich, räumlich und quantitativ verfolgen (COONS und KAPLAN, 1950; WELLER und COONS, 1954; BEUTNER, 1961; RAPP und MELNICK, 1964).

Trotz aller Vorteile, die der Infektionsnachweis durch IFT bietet, muß bei seiner Beurteilung einschränkend darauf hingewiesen werden, daß es sich hierbei um einen reinen Antigennachweis handelt und somit keine Aussage darüber gemacht werden kann, ob die fluoreszenzpositive Zelle komplettes infektiöses Virus gebildet hat. Zum anderen schließt ein negatives Ergebnis nicht aus, daß die Zelle trotzdem infiziert ist und Antigen evtl. erst zu einem späteren Zeitpunkt produziert (WALKER, 1964).

NUKLEIN- SÄURE	VIRUSGRUPPE	VIRUSSPECIES	LITERATUR
RNS	Arenavirus	V. der lymphozytären Choriomeningitis	7; 10; 12; 82; 83; 84; 100; 103; 207
		Lassa-V.	24
		Junin-, Machupo-V.	14; 24
	Oncornavirus (?)	V. der Infektiösen Anämie d. Einhufer	37; 196
	Paramyxovirus	Masern-V.	49; 54; 156; 167
		Mumps-V.	202; 203
	Reovirus	Reo-V.	162; 183
	Rhabdovirus	Tollwut-V.	55; 212; 213
	Togavirus (?) (?)	Lactat-Dehydrogenase- V.	148
		Rubella-V.	19; 214
		Schweinepest-V.	4; 22; 39; 107; 131; 132; 133; 160; 181; 195
	?	Visna-, Maedi-V.	72; 193
DNS	Herpesvirus	Cytomegalie-V.	158
		Epstein-Barr-V.	67; 68; 75
		Marek Disease-V.	26; 138; 152
	Iridovirus (?)	V. der Afrikanischen Schweinepest	79
	Parvovirus	Felines Panleukopenie-V.	88; 165
?	?	V. der Aleutenkrank- heit der Nerze	149
		Borna-V.	40

Tabelle 2: Zusammenstellung einiger Literaturstellen
zur Immunofluoreszenz - Technik

2.2.4.1.2 Immunoperoxidase-Technik

Ein weiteres Nachweisverfahren verwendet Peroxidase nach Kopplung an Antikörper zur Darstellung intrazellulär lokalisierter Virusantigene. Die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe werden dadurch sowohl im Licht- als auch im Elektronenmikroskop sichtbar. Hiermit konnten virusspezifische Antigene z.B. bei LCM-Virus (ABELSON und Mitarb., 1969) und Masern-Virus (DUBOIS-DALCQ und HORTA-BARBOSA, 1973; DUBOIS-DALCQ und Mitarb., 1974) an den Orten von Zelleinschlußkörperchen lokalisiert werden.

2.2.4.1.3 Immunoferritin-Technik

Zur Sichtbarmachung von Antigen im Elektronenmikroskop dienen auch Ferritin - markierte Antikörper. Mit Hilfe dieser Technik wurde z.B. bei ASP-Virus die Beteiligung von Antigen bei der Bildung von zytoplasmatischen Einschlüssen festgestellt (BREESE und DeBOER, 1966; BREESE und Mitarb., 1967).

2.2.4.1.4 HämadSORption und HämadSORptionshemmung

Die HämadSORption (HAD) kann zum Nachweis derjenigen Virusarten verwendet werden, bei denen im Rahmen der Virus-synthese Hämagglutinin in die Zellmembran eingebaut wird. Als Indikator dienen Erythrozyten, die bei Zugabe gebunden werden (VOGEL und SHELOKOV, 1957).

Der HAD-Test ist streng zellgebunden; zellfreies Hämagglutinin (COGGINS, 1974) oder freigesetzte Viruspartikel (MALMQUIST, 1963; BREESE und HESS, 1966; LARENAUDIE und

Mitarb., 1967) sind dabei nicht beteiligt. Er stellt somit eine Nachweismöglichkeit für Infektionen mit größtenteils zellassoziertem Virus dar (SEVER, 1973).

Bedeutung besitzt der HAd-Test für Masern-Virus (ROSANOFF, 1961; ZEMAN und LENNETTE, 1973), Mumps-Virus (WALKER und HINZE, 1962a/b), Rubella-Virus (SCHMIDT und Mitarb., 1968; STANWICK und HALLUM, 1974) und dem Virus der Afrikanischen Schweinepest (MALMQUIST und HAY, 1960; COGGINS, 1966; MOULTON und COGGINS, 1968).

Wie die Hämagglutination ist auch die HämadSORPTION nicht spezifisch, sondern nur hinweisend. Zur Virus-Spezifizierung steht jedoch der HAd-Hemm-Test (SCHMIDT und Mitarb., 1968) zur Verfügung, der auch die Unterscheidung verschiedener Virusstämme erlaubt (MALMQUIST, 1963; CARNERO und Mitarb., 1967; COGGINS, 1968).

2.2.4.2 Nachweis von freigesetztem Antigen

Einige persistent infizierte Zellkulturen bilden und entlassen zwar kaum infektiöses Virus, dafür aber Antigene, die sich mit Hilfe der

Komplementbindungsreaktion (KBR),
Präzipitation oder
Hämagglutination (HA)

nachweisen lassen.

2.2.4.2.1 Komplementbindungsreaktion

Komplementbindendes Antigen läßt sich bei vielen persistenten Virusinfektionen routinemäßig und mit verhältnismäßig

geringem technischen Aufwand nachweisen:

Eine bewährte Technik beschrieben LEHMANN-GRUBE und HESSE (1967) für Nachweis und Titration von LCM-Virus in Zellkulturen. Bei diesem Virus schwanken die freigesetzten Antigenmengen je nach Kultursystem und Infektionsstadium beträchtlich (ACKERMANN, 1961; BROWN und KIRK, 1969; LEHMANN-GRUBE, 1971).

Sogenannte "nonproducer"-Lymphozytenkulturen enthalten das Epstein-Barr-Virusgenom ohne dabei Virionen, Membranantigene, "early antigen" oder virales Capsid-Antigen zu produzieren. POPE und Mitarb. (1969) wiesen anhand eines Antigens, das in der KBR mit Anti-Epstein-Barr-Virusseren reagierte, nach, daß einige funktionelle Aktivitäten des Virusgenoms in den Zellen erhalten sind.

Auch bei persistent mit Borna-Virus infizierten Zellkulturen wurde komplementbindendes Antigen nachgewiesen; dabei schien die Menge des produzierten Antigens von der Zellart abzuhängen (MAYR und DANNER, 1972a; LUDWIG und Mitarb., 1973). Weitere Anwendung findet die KBR z.B. bei Zellkulturen, die mit dem Virus der infektiösen Anämie der Einhufer infiziert sind (HENSON und Mitarb., 1970; KOBAYASHI, 1961).

2.2.4.2.2 Präzipitation

Die Darstellung von Präzipitaten, die bei der Reaktion von Antigen aus persistent infizierten Zellkulturen mit Antisera in Agargel gebildet werden, ermöglicht einen weiteren Antigennachweis. Eine Standardtechnik dieser

Agargelpräzipitation (Immunodiffusion) wurde von WADSWORTH (1957) beschrieben.

Zum Nachweis von Schweinepest-Virusantigen ist dieser Test das älteste serologische Verfahren (MOLNÁR, 1954; MANSI, 1957 und 1963; DARBYSHIRE, 1962 und 1965; MAHNEL und MAYR, 1974).

Weiterhin läßt sich dieses Verfahren zum Nachweis von Antigen in Zellpräparationen und im Kulturüberstand bei Infektionen mit Marek-Virus (CHUBB und CHURCHILL, 1968; PURCHASE und Mitarb., 1971), LCM-Virus (BARLOW und MUSTICO, 1966) und dem Virus der Afrikanischen Schweinepest (MALMQUIST, 1963; HESS, 1971) verwenden. Bei letzterem gelang eine weitgehende Spezifizierung der Antigen-Isolate durch sog. "isoelektrische" Präzipitation (STONE und HESS, 1965). GARFINKLE und MCAUSLAN (1973) verglichen anhand der Präzipitation die Antigenbildung der nicht produktiven Herpes simplex-Virusinfektion in einer transformierten Rattenzell-Linie mit der produktiven in Kaninchennierenzellen; sie ermittelten (der Antigenproduktion entsprechend) fünf präzipitierende Linien für die produktive aber nur eine oder zwei für die nicht produktive Infektion.

2.2.4.2.3 Hämagglutination

Manche persistent infizierten Zellkulturen produzieren ein virales Hämagglutinin, das durch Erythrozyten bestimmter Species nachgewiesen werden kann (HA). Die unspezifische Hämagglutination läßt sich dann im standardisierten Hämagglutinations-Hemm-Test (HAH) spezifizieren. Als schneller Antigennachweis wird sie z.B. bei Infektionen mit Rubella- (NORRBY, 1969), Masern- (LENNETTE und SCHMIDT, 1964) oder Parainfluenza-Virus (WATERS und Mitarb., 1974) eingesetzt.

DUBOIS-DALCQ und Mitarb. (1974) testeten die hämagglutinierende Aktivität im Medium von Zellkulturen, die mit Virus-Isolaten aus SSPE (Subakut Sklerotisierende Panenzephalitis)-Gehirnen infiziert waren, vergleichend an einer produktiven und nicht produktiven Infektion; dabei ließen sich hämagglutinierende Antigene nur in der produktiven Infektion nachweisen.

2.2.5 Nachweis von infektiösem Virus

Mit den bisher beschriebenen Methoden kann zwar nachgewiesen werden, daß die jeweiligen Zellen persistent infiziert sind, über die Bildung von infektiösem Virus sind damit aber keine Aussagen möglich. Deshalb sind zum Nachweis der Infektiosität zusätzliche Übertragungsversuche auf ein sensibles System nötig.

2.2.5.1 Nachweis von infektiösem Virus im Versuchstier

Obwohl es bei den meisten persistierenden Viren gelang, das Versuchstier durch entsprechende In vitro-Systeme zu ersetzen, ist es für den Infektiositätsnachweis in einigen Fällen immer noch das System der Wahl.

Die Infektiosität von Explantat- und deren Subkulturen aus Borna-Virus-infizierten Kaninchengehirnen wiesen MAYR und DANNER (1972) durch intracerebrale Übertragung einer Mischung aus Medium und mittels Ultraschall aufgeschlossener Zellen auf Kaninchen nach. Zur Beurteilung dienten dabei die Kriterien für eine typische Borna-Virusinfektion. SIGURDSSON und Mitarb. (1960) benutzten den Schafversuch zum Nachweis der Infektiosität von Kulturpassagen mit Visna-Virus infizierter Schafzellen.

Für Scrapie-Agens (CHANDLER, 1961; GUSTAFSON und KANITZ, 1964) und Lactat-Dehydrogenase-Virus (RILEY, 1968) ist der Mäuseversuch die einfachste und genaueste Methode zum Infektiositätsnachweis.

2.2.5.2 Nachweis von infektiösem Virus im
 Hühnerei

Dieses Nachweisverfahren hat für persistierende Viren nur noch in wenigen Fällen Bedeutung.

Die Infektiosität von Sendai-Virus wird durch Infizierung von embryonierten Hühnereiern getestet (SUGAMURA und Mitarb., 1974; KIMURA und Mitarb., 1975).

2.2.5.3 Nachweis von infektiösem Virus in
 Zellkulturen

Für die meisten persistierenden Viren wurden mittlerweile sog. "permissive" Zellsysteme gefunden, in denen sie sich nach Übertragung aus dem "carrier"-System mit deutlich sichtbarem lytischem Effekt vermehren. Dieses stellt das einfachste Verfahren zum Infektiositätsnachweis dar.

Standardisierte Plaque-Tests, wie sie z.B. für Tollwut-, LCM- und andere Viren in BHK₂₁-Zellen entwickelt wurden (SEDWICK und WIKTOR, 1967), ermöglichen gleichzeitig Titrationen.

2.3

METHODEN ZUR AKTIVIERUNG PERSISTENTER VIRUSINFEKTIONEN IN VITRO

2.3.1

Allgemeines

Trotz der Vielzahl an Nachweisverfahren gibt es persistente Virusinfektionen, die damit nicht oder nur unzureichend feststellbar sind. Oft sind zu wenige Zellen der zu untersuchenden Population infiziert, bzw. die nachzuweisenden Infektionsmerkmale sind allgemein zu schwach ausgeprägt. Mit bestimmten Methoden wird versucht, derartige versteckte Virusinfektionen zu aktivieren, d.h. entweder eine künstliche Steigerung der Virusausbreitung zu erzielen, um mehr Zellen einer Kultur zu infizieren, oder die Virus- bzw. Antigensynthese innerhalb der Zellen anzuregen. In diesem Zusammenhang dient die Aktivierung persistenter Infektionen als Vorstufe für den I n f e k t i o n s n a c h w e i s, der danach mit den beschriebenen Methoden erfolgen kann. Im extremen Fall gelingt damit die Überführung einer nicht lytischen Infektion in eine lytische, die sich bereits nativ-lichtmikroskopisch darstellen läßt.

Die Aktivierung persistenter Infektionen verfolgt aber auch den Zweck der V i r u s g e w i n n u n g, die bei den persistenten Infektionen durch die gehemmte Virusproduktion innerhalb der Zellkultur und die gehemmte Virusfreisetzung labortechnisch oft erschwert ist. Eine Anzahl persistierender Virusarten, wie z.B. Marek-Virus (PURCHASE, 1974), Cytomegalie- und Epstein-Barr-Virus (JACK, 1974; HOTCHIN, 1971), Masern-Virus (FENNER und WHITE, 1971), Scrapie-Agens (CLARKE und HAIG, 1970) und zum Teil auch Tollwut-Virus (FERNANDES und Mitarb., 1964) breiten sich in der Zellkultur hauptsächlich direkt von Zelle zu Zelle aus, ohne daß größere Mengen Virus ins Medium gelangen.

In einigen dieser Fälle hat sich herausgestellt, daß über eine vorausgehende künstliche Aktivierung der Virussyntese eine Steigerung der Virusausbauung erzielt ist. Weitergehend konnte damit bei einigen infizierten Kulturen die ausschließlich zelluläre Virusausbauung unterbrochen werden, wobei größere Mengen bisher rein zellgebundenen Virus ins Medium freigesetzt wurden. Die Virusgewinnung aus dem Medium stellt aber ein wichtiges labortechnisches Verfahren dar, um möglichst reine Viruspräparationen (z.B. für physikalisch-chemische Untersuchungen) zu erhalten.

2.3.2 Exogene Zufuhr von Antimetaboliten

Einige Kultursysteme bilden bei Virusinfektionen zelluläre Substanzen, die eine Virusvermehrung hemmen. Einer dieser Stoffe, das zellspezifische Interferon, blockiert vermutlich die Übertragung der Information der viralen "Boten"-RNS auf Ribosomen und verhindert so die Virussyntese (MAYR und Mitarb., 1974). Der Wirkungsmechanismus anderer mit der Virusvermehrung interferierender Substanzen ist meistens ungeklärt (ST. JEOR und RAPP, 1973a).

Einige chemische Stoffe (sog. Antimetaboliten), die selektiv hemmend in den Zellstoffwechsel eingreifen, können die Bildung dieser zellulären Hemmstoffe unterdrücken.

Dazu gehören die halogenierten Desoxyuridine als Hemmer der DNS-Syntese und Actinomycin D als Hemmer der DNS-abhängigen RNS-Syntese und damit der Interferonproduktion.

In einigen Fällen persistenter Infektionen, bei denen die Virusvermehrung durch zelluläre Mechanismen unterdrückt wird, kann mit Antimetaboliten als Mediumzusatz eine Aktivierung der Virussyntese erreicht werden.

2.3.2.1 Halogenierte Desoxyuridine

Umfangreiche Untersuchungen beschäftigten sich in letzter Zeit mit der Aktivierung persistenter Herpesvirus-Infektionen durch 5-Iod-2'-Desoxyuridin (IdU) und 5-Brom-2'-Desoxyuridin (BdU), insbesondere von Cytomegalie- und Epstein-Barr-Virus:

Humanes Cytomegalie-Virus konnte bisher nur in menschlichen Fibroblastenkulturen vermehrt werden (HANSHAW, 1968); durch Vorbehandlung mit IdU erreichten ST. JEOR und RAPP (1973a) seine Vermehrung in foetalen menschlichen Nierenzellen, die bisher als kaum empfänglich galten. Sie berichteten von Virustitern, die um drei Zehnerpotenzen über denen der unbehandelten Kontrollen lagen. Zusätzlich konnten sie (1973b) mit IdU in den auch ohne Aktivierung empfänglichen menschlichen Fibroblasten sowohl die Virussyntese als auch die -freisetzung um das Vierfache steigern.

Epstein-Barr-Virus hat von den Herpesviren die größte Zellspezifität (JACK, 1974) und ließ sich bisher nur in kontinuierlichen Lymphoblastoid-Zellkulturen von Burkitt-Tumoren züchten (EPSTEIN und Mitarb., 1964). Obwohl es als sicher gilt, daß das Epstein-Barr-Virusgenom zumindest in Teilen im Zellgenom dieser Wirtszellen enthalten ist (ZUR HAUSEN und SCHULTE-HOLTHAUSEN, 1970; NONOYAMA und PAGANO, 1971), tritt nur bei einem Teil dieser infizierten Zell-Linien spontane Aktivierung mit Antigenbildung auf; KLEIN und Mitarb. (1972) teilten sie deshalb in sog. "producer cells" und "nonproducer cells" ein. In zahlreichen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß durch IdU und BdU die Antigen-synthese in den "nonproducer cells" angeregt und in den "producer cells" verstärkt wird (GERBER, 1972; GLASER und RAPP, 1972; HAMPAR und Mitarb., 1972/1973). Eine Freisetzung von Virus schien dabei allerdings nicht zu erfolgen (GLASER und RAPP, 1972).

In L-Zellen, in denen sich LCM-Virus normalerweise ohne cpE vermehrt, konnten PFAU und Mitarb. (1965) in Anwesenheit von Fluor-Desoxyuridin (FdU) einen degenerativen cpE mit vermehrter Virusfreisetzung erzeugen.

2.3.2.2 Actinomycin D

Die Hemmwirkung von Actinomycin D auf die Interferonproduktion persistent infizierter Zellen wurde bei Untersuchungen mit Tollwut-Virus von WIKTOR und CLARK (1972) bestätigt und konnte dazu ausgenützt werden, die Zahl der infizierten Zellen in der Kultur zu erhöhen. Die Virusaussbeute steigerte sich bei persistent mit Borna-Virus infizierten Zellkulturen nach Actinomycin D - Behandlung um das Zehnfache (DANNER und MAYR, 1975); eine Erhöhung der Virussynthese in persistent Masern-Virus-infizierten Kulturen wurde von MATUMOTO (1966) beobachtet.

2.3.3 Änderung der Milieufaktoren

Änderungen am Zellkultursystem, in dem das Virus persistiert, wie

- Ernährungsverschiebungen,
- Veränderung der Züchtungstemperatur und
- Subkultivierung über mehrere Passagen

führen in einigen Fällen zur Aktivierung von Virussynthese und -freisetzung.

2.3.3.1 Ernährung der Wirtszellen

Nach Angaben von KLEIN (1972) wurde die Epstein-Barr-Virus-synthese in Zell-Linien durch Mangelerernährung gesenkt. Einen entgegengesetzten Mechanismus schilderten WALKER und HINZE (1962a/b) bei einer persistenten Mumps-Virusinfektion in menschlichen Konjunktiva-Zellen. Unter normalem Wachstumsmedium trat nur an 1% der Zellen HämadSORPTION auf. Sobald sich das Medium aber erschöpfte oder der Serumgehalt reduziert wurde, stieg der hämadSORbierende Anteil auf 50-90% und der Virusgehalt im Medium um das Zehnfache.

2.3.3.2 Züchtungstemperatur

WALKER und HINZE (1962a/b) konnten eine Aktivierung in persistent mit Mumps-Virus infizierten Zellen außer durch MangelerNährung auch durch Senkung der Züchtungstemperatur von 37°C auf 33°C erzielen.

Persistent Sendai-Virus-infizierte BHK-Zellen begannen in einem Versuch von KIMURA und Mitarb. (1975) nur dann infektiöses Virus zu produzieren, wenn die Inkubationstemperatur von 38°C auf 32°C gesenkt wurde.

2.3.3.3 Zahl der Viruspassagen

Ein Beispiel für die zunehmende Aktivierung persistenter Virusinfektionen im Verlauf mehrerer Zellkulturpassagen liefert humanes Cytomegalie-Virus:

Niedere Viruspassagen setzen nur wenig Virus frei; aber gewöhnlich mit der zehnten Subkultivierung wird eine starke Freisetzung mit Zerstörung der Kultur beobachtet (JACK, 1974).

GUSTAFSON und KANITZ (1964) berichteten, daß mit Scrapie-Agens infizierte Schafzellkulturen erst in der 34. Passage freies, für Mäuse infektiöses Agens produzierten.

2.3.4 Schaffung geeigneter Zellkultursysteme

Durch die Wahl eines geeigneten Zellkultursystems (sog. permissive Zellen) kann die Aktivität einer persistenten Virusinfektion beeinflußt werden. Im einfachsten Fall gelingt das bereits durch den Wechsel auf eine andere Zellart. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Schaffung von Spezialzellen durch Co-Kultivierung und Zellfusion, Verfahren, die vor allem zur Aktivierung infizierter Explantatkulturen verwendet werden.

2.3.4.1 Wechsel auf andere Zellart

Vielfach gelingt die Aktivierung persistenter Infektionen durch die Adaptation des Virus an eine andere Zellart (EVANS und SALAMAN, 1965; CALNEK und Mitarb., 1972; LEE und Mitarb., 1973; COGGINS, 1974).

Das Virus der Afrikanischen Schweinepest vermehrt sich in Schweinenieren-Zellen streng zellassoziiert (COGGINS, 1966; PLOWRIGHT und Mitarb., 1966), dagegen nach Adaptation an "buffy coat"-Kulturen mit Virusfreisetzung ins Medium (MOULTON und COGGINS, 1968; COGGINS, 1966).

Visna-Virus wird zwar regelmäßig ins Kulturmedium freigesetzt (THORMAR, 1960), aber auch hier hängt die Menge des freigesetzten Virus, neben Infizierungsdosis und Serumkonzentration im Medium, von der Zellart ab (THORMAR und Mitarb., 1974).

2.3.4.2 Co-Kultivierung

Die Co - Kultivierung zweier verschiedener Zellarten kann zur Umwandlung einer latenten Infektion in eine produktive führen. Diese Methode findet hauptsächlich Verwendung, wenn schlecht haltbare Explantatkulturen aus persistent infizierten Geweben, z.B. zur Virusisolierung, weitergezüchtet werden sollen; die Co-Kultivierung erfolgt dabei meistens mit Zell-Linien.

LUDWIG und Mitarb. (1973) nutzten diesen Effekt bei Co-Kultivierung persistent mit Borna-Virus infizierter Explantatzellen mit AGMK-Zellen aus.

DUBOIS-DALCQ und Mitarb. (1974) co-kultivierten Gehirngewebs- bzw. Lymphknotenzellen eines Patienten mit SSPE und HeLa-Zellen und erzielten damit eine produktive Infektion. Eine von DOI und Mitarb. (1972) durch Züchtung von SSPE-Gehirn-explantatzellen mit Vero-Zellen erstellte Zell-Linie dagegen blieb trotz mehrfach wiederholter Co-Kultivierung mit nicht infizierten Vero-Zellen latent.

2.3.4.3 Zellfusion

Im Unterschied zur Co-Kultivierung, bei der verschiedenartige mononukleäre Zellen in einer Kultur parallel auftreten, kommt es bei der Zellfusion zur Verschmelzung zweier oder mehrerer Zellen, es bilden sich polynukleäre Synzytien oder heterozygote Zellen. Zur Aktivierung einzelner persistenter Infektionen kann die Fusion durch hohe Konzentrationen inaktivierter Paramyxoviren (OKADA, 1962) oder bioaktive Substanzen, wie z.B. Lysolecithin, künstlich herbeigeführt werden.

Durch Fusion Marek-Virus-infizierter und normaler Zellen erreichte HLOZANEK (1970) eine Steigerung der Virussynthese.

YAMAMOTO und Mitarb. (1975) fusionierten mit Hilfe von inaktiviertem Sendai-Virus unproduktive menschliche Lymphoidzellen, die sowohl das Epstein-Barr- als auch das Typ-C-Virusgenom in sich trugen, mit nicht infizierten Mäuse- bzw. Humanzellen. In einigen Fällen trat daraufhin eine Infektionsaktivierung auf, die anhand der gesteigerten Antigenproduktion durch Immunofluoreszenz beobachtet wurde. Da die Kerne der persistent infizierten Zellen vor der Fusion mit (^3H)-Thymidin markiert worden waren, konnte deren Anteil an den Synzytien durch direkte Autoradiographie bestimmt werden. TER MEULEN und Mitarb. (1972a) verwendeten Lysolecithin zur Fusionierung von CV₁-Zellen mit Multiple Sklerose-Gehirnzellen; die dabei erzielte Infektionsaktivierung ermöglichte die Isolierung eines Parainfluenza-Virus Typ 1.

2.3.5 Doppelinfektion

In seltenen Fällen kann durch Superinfektion persistent infizierter Kulturen mit heterologen Viren eine Aktivierung erreicht werden. Der genaue Mechanismus hierfür ist nicht bekannt; diskutiert wird eine Hemmung der zellulären Interferon-Produktion durch das superinfizierende Virus.

KOPROWSKI und Mitarb. (1966) infizierten menschliche Diploid-Zellen (WI 38) mit Tollwut-Virus. In der Immunofluoreszenz reagierten maximal 2 - 12% der Zellen positiv, und das Medium enthielt weniger als 10^2 Mäuse-LD₅₀ pro 0,03 ml. Nach Superinfektion mit LCM-Virus stieg der Anteil immunofluoreszenz-positiver Zellen auf 80 - 100% und die Infektiosität des Mediums 20 - 100-fach. Der Aktivierungseffekt trat sowohl bei persistent infizierten Zellen auf, als auch bei Kulturen, die bereits 24 Stunden vor der Infizierung mit Tollwut-Virus mit LCM-Virus beschickt wurden. Die vorherige Bestrahlung des LCM-Virus mit ultravioletem Licht reduzierte den Steigerungseffekt.

Vergleichsuntersuchungen bei Superinfektion mit Rubella-, Vesikuläre Stomatitis-, Newcastle Disease- und SV40-Virus verliefen durchwegs negativ.

Eine Stimulierung der Tollwut-Virusinfektion durch LCM-Virus konnte auch in BHK₂₁- und Kaninchenendothelzellen beobachtet werden (WIKTOR und Mitarb., 1966; LEHMANN-GRUBE, 1971).

2.4 METHODEN ZUR GEWINNUNG VON INFEKTIÖSEM VIRUS AUS PERSISTENT INFIZIERTEN ZELLKULTUREN

2.4.1 Allgemeines

Für viele persistente Virusinfektionen ist die strenge Zellgebundenheit des beteiligten Virus typisch. Zellextrakte besitzen sehr wenig Infektiosität, bzw. die Infektiosität ist sehr labil und wird im Verlauf der üblichen Gewinnungsverfahren rasch inaktiviert. Eine Möglichkeit, dies zu umgehen, besteht darin, die gehemmte Virusfreisetzung ins Medium durch künstliche Aktivierungsmethoden zu induzieren (vgl. Abschnitt 2.3). In den Fällen, in denen das nicht gelingt, wie z.B. bei Marek-Virus (PURCHASE, 1974), müssen spezielle Methoden zur schonenden, maximalen Virusgewinnung verwendet werden:

1. Zellaufschlußverfahren mittels Zellzerstörung,
2. Extraktionsverfahren ohne Zellzerstörung,
3. Einsatz von speziellen Virus - Stabilisatoren.

2.4.2 Zellaufschlußverfahren

Neben den üblicherweise verwendeten Standardverfahren zum Zellaufschluß wie Ultraschallbehandlung und schnelles Gefrier-Tauen wurden speziell für persistent infizierte Kulturen einige Methoden beschrieben:

LEE und Mitarb. (1971) behandelten Marek-Virus-infizierte Zellen mit einem "Reticulocyte Standard Buffer" (RSB) und

gewannen anschließend zellfreies Virus aus der homogenisierten Zytoplasmafraktion.

COOK und SEARS (1970) lysierten infizierte Zellen mit demineralisiertem Wasser und erhielten so zellfreies Marek-Virus.

2.4.3 Extraktionsverfahren

HALLAUER und KRONAUER (1965) berichteten von einem Extraktionsverfahren unter Verwendung eines 0,05M Borat- oder 0,2M Glycin-Puffers, welches u.a. die beinahe vollständige Gewinnung von zellassoziertem Reo-Virus ermöglichte; selbst nach mehrmals wiederholter Anwendung war der Zellrasen unzerstört. Sie vermuteten, daß die Pufferbehandlung nur den normalen Freisetzungsprozess, evtl. durch Schwächung der "physikalisch-chemischen Zellschranke", unterstützt, da im Elektronenmikroskop ähnliche Zellveränderungen sichtbar waren wie bei physiologischer Virusausschleusung.

PROBSTMEYER und Mitarb. (1967) übernahmen dieses Verfahren für die Extraktion von Cytomegalie-Virus, stellten dabei aber vergleichend fest, daß die Gewinnung durch Ultraschallaufschluß wesentlich effektiver war; v.a. schienen durch Glycin-Puffer vorwiegend nicht-infektiöse Partikel freigesetzt zu werden.

2.4.4 Verwendung von speziellen Virus- Stabilisatoren

Im Hinblick auf den Effekt der normalen Zellaufschlußverfahren berichteten CHURCHILL und BIGGS (1968), daß 99% der Infektiosität einer mit Marek-Virus infizierten Zellkultur

durch Behandlungen zerstört werden, welche die lebenden, stabilisierenden Zellen vom Virus trennen, wie z.B. Gefrier-Tauen, Ultraschall, Lyophilisierung, hochtouriges Zentrifugieren und Filtration. Zusätzlich zur schonenden Isolierungstechnik aus den Zellen sind deshalb Verfahren nötig, die das Virus im Extrakt vor Inaktivierung schützen.

Bei der Gewinnung von Rubella- (NORRBY, 1969) und Marek-Virus (LEE, 1971) wird durch Zugabe von EDTA als "Chelator" die Inaktivierung bei der Lagerung vermindert. Um die Infektiosität von extrahiertem Puten-Herpesvirus zu erhalten, versetzten CALNEK und Mitarb. (1972) die gewonnene Virus-suspension mit einem "SPGA"-Stabilisator (bestehend aus Saccharose, prim. und sek. Kaliumphosphat, Natriumglutamat und Rinderserumalbumin); im Gegensatz zum verwandten Marek-Virus erwies sich hier Zugabe von EDTA als ungünstig.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 MATERIAL UND METHODEN

3.1.1. Virusmaterial

Zur Verwendung kam der vom Pferd isolierte Borna-Virus-Stamm M 28:

1. als Gehirnvirus nach vier Kaninchen-Gehirn-Passagen. Zur Aufbereitung wurden die Gehirne mechanisch homogenisiert (ULTRATURRAX), als 1%ige Suspension in TC 199-Anzuchtmedium (Fa. DIFCO) 30 Sek. ultraschallt (Sonifier S 75 der BRANSON INSTR. INC.) und anschließend 10 Min. bei 2000 g zentrifugiert; verwendet wurde der Überstand. Seine Infektiosität betrug mindestens $10^{6,0}$ Kaninchen LD_{50} pro ml (i.cer. Infektion).
2. als Kulturvirus nach Vermehrung in Affennieren-Zellen (CV₁-Linie). Falls in den Versuchen nicht anders angegeben, erfolgte die Virusextraktion durch einmaliges Gefrier-Tauen (bei -70°C) der Zellen mit Erhaltungsmedium und anschließende Ultraschallbehandlung (30 Sek.); verwendet wurde der Überstand nach 10 Min. Zentrifugation bei 2000 g.
3. In Versuch 7 dienten persistent mit Borna-Virus infizierte Kaninchennieren-Zellkulturen (RK₁₃-Linie) (DANNER, 1975), die bei fluoreszenzserologischer Auswertung einen Anteil von mindestens 30% antigenhaltiger Zellen aufwiesen, als Ausgangsmaterial zur Virusgewinnung.

3.1.2 Versuchstiere

Als Versuchstiere zur Blutzellgewinnung und zur Infizierung dienten Kaninchen beiderlei Geschlechts im Alter von ca. 6 Wochen, die in Holzboxen gehalten und mit Pellets und Wasser ad libitum ernährt wurden. Die intracerebrale Infizierung der Tiere geschah in leichter Narkose (Äther-Chloroform-Gemisch) in der üblichen Weise.

3.1.3 Zellkulturen

Die Untersuchungen wurden in Primärzellkulturen und in Zell-Linien durchgeführt:

3.1.3.1 Anlage der Primärkulturen

Die verwendeten Primärzellen sowie die entsprechenden Nährmedien sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Im wesentlichen erfolgte die Kultivierung der Gehirn-, Nieren-, Hoden- und Hautzellen nach der Trypsinierungsmethode von DULBECCO und VOGT (1952). Nach mechanischer Zerkleinerung der Gewebsstücke wurden die Zellen durch Trypsinierung mit PBS-T (phosphatgepufferte Saline + 0,25% Trypsin) und Filtration durch sterile Gaze gewonnen und nach Zentrifugation (5 Min. bei 500 g) im jeweiligen Anzuchtmedium resuspendiert und in Kulturgefäße eingesät.

Abweichend davon dienten bei den Kulturen aus Gehirnen infantiler Kaninchen (BKG) die antrypsinierten Gewebsstückchen zusammen mit den abtrypsinierten Zellen zur Einsaat.

Die Herstellung der Hühnerembryofibroblasten-Kulturen (FHE) hatte die Methode nach MAYR und KALCHER (1960) zur Vorlage.

Tabelle 3: Zur Züchtung von Borna-Virus verwendete Primärzellen

<u>SPECIES</u> (Alter)	<u>ZELLART</u>	<u>EINSAAT</u> (pro ml Medium)	<u>ANZUCHTMEDIUM</u>	<u>ERHALTUNGSMEDIUM</u>
<u>KANINCHEN</u> 1-tägig	Gehirnzellen	2 Vol.%/Geh.	TC199+10%FKS+10%LA	TC199+5%FKS
"-	Nierenzellen	7,5 x 10 ⁵	"-	"-
juvenil/ adult	Blutlymphozyten	5 x 10 ⁵	Eigenserum	dto.
"-	Milzstromazellen	Explantat	L15+10%FKS	L15+5%FKS
"-	Milzpulpazellen	1,5 x 10 ⁶	TC199+10%FKS	dto.
"-	Peritonealzellen	5 x 10 ⁵	"-	dto.
"-	Peritoneal- makrophagen	5 x 10 ⁵	TC199+20%KS	dto.
<u>HUND</u> infantil	Nierenzellen	3 x 10 ⁵	Hanks+10%KS+10%LA	Hanks+2%KS+10%LA
<u>PFERD</u> foetal	Nierenzellen	1 x 10 ⁶	Earle's+20%KS+10%LA	Earle's+10%LA
<u>SCHWEIN</u> adult	Nierenzellen	6 x 10 ⁵	TC199+10%KS	TC199+5%KS

Tabelle 3: Fortsetzung

<u>RIND</u> foetal	Hodenzellen	5 x 10 ⁵	Earle's+10%KS+10%LA	Earle's+2%KS+10%LA
ca. 8 Wo.	"-	4 x 10 ⁵	"-	"-
"-	Nierenzellen	5 x 10 ⁵	"-	"-
<u>SCHAF</u> foetal	Gehirnzellen	1 x 10 ⁶	TC199+10%FKS	TC199+5%FKS
"-	Hautzellen	5 x 10 ⁵	Earle's+10%KS+10%LA	Earle's+2%KS+10%LA
"-	Hodenzellen	4 x 10 ⁵	"-	"-
"-	Nierenzellen	7,5 x 10 ⁵	"-	TC199+5%KS
infantil	"-	5 x 10 ⁵	"-	Earle's+2%KS+10%LA
<u>HUHN</u> Brutei 12-tägig	Gehirnzellen	1 x 10 ⁶	TC199+10%FKS+10%LA	TC199+5%FKS
Brutei 10-tägig	Fibroblasten	7,5 x 10 ⁵	Earle's+10%KS+10%LA	RAF
<u>MENSCH</u> foetal	Nierenzellen	8 x 10 ⁵	"-	Earle's+2%KS+10%LA

Milzstroma - Zellkulturen von Kaninchen wurden nach dem Explantatverfahren (HALLAUER, 1930) angelegt. Aus explantierten Milzstückchen von ca. 1 mm³ Größe (Antrocknungszeit in den Kulturgefäßen 30 Min. bei 37°C) wuchsen innerhalb einer Woche fibroblastische Zellen aus, die sich zu einem Zellrasen vereinigten.

Die Isolierung von **Milzpulpa** - Zellen aus Kaninchenmilzen erfolgte nach den Angaben von MOCARELLI und Mitarb. (1973). Steril entnommene Kaninchenmilzen wurden durch ein Stahl-drahtgeflecht (lichte Maschenweite 0,5 mm) gerieben, die gewonnenen Pulpazellen in Medium suspendiert und zum Sedimentieren größerer Teilchen über foetales Kälberserum geschichtet. Nach 10 Min. wurde der Überstand abpipettiert und 10 Min. bei 800 g zentrifugiert, das Sediment zur Lysierung der Erythrozyten mit 0,83%iger Ammoniumchloridlösung (in Aqua dest.) versetzt und nach 5 Min. im Eisbad erneut durch foetales Kälberserum zentrifugiert (7 Min. bei 500 g). Das letzte Zentrifugat enthielt die Milzpulpa-Zellen ohne Erythrozyten.

Die **Blutlymphozyten** - Gewinnung aus Kaninchen entsprach dem Verfahren nach SCHMIDT (1974). Von Kaninchen gewonnenes Schüttelblut wurde mit PBS im Verhältnis 1:1 verdünnt und ein Teil der Mischung auf zwei Teile eines Gemisches aus Ficoll (PHARMACIA, Uppsala) und Ronpacon (CILAG CHEMIE, Alsbach) - 24 Teile 9% Ficoll in Aqua dest. plus 10 Teile 34% Ronpacon in Aqua dest. - geschichtet und 20 Min. bei 400 g zentrifugiert. Die Lymphozytenfraktion erschien als ringförmige Schicht über dem Ficoll-Ronpacon-Gemisch und konnte mit einer Glaskapillare abgesaugt werden. Die Zellen wurden kurz in TC-Medium 199 gewaschen, 30 Sek. bei 2500 g zentrifugiert und in autologem Serum resuspendiert.

Peritonealmakrophagen - Kulturen (Kaninchen)
wurden nach der Methode von BENNETT (1966) angelegt. Aus den Bauchhöhlen unter tiefer Äther-Chloroform-Narkose entbluteter Kaninchen wurde nach i.p. Injektion von 100 ml Spülmedium pro Kaninchen die Peritonealflüssigkeit abpipetiert. Abweichend von BENNETT bestand das Spülmedium aus 80% TC-Medium 199, 20% Kälberserum sowie Antibiotika- und Heparinzusatz (pro ml 200 I.E. Penicillin, 200 µg Streptomycin und 5 E. Heparin). Nach Zentrifugation (10 Min. bei 300 g) und Resuspendierung in Anzuchtmedium (= Spülmedium ohne Heparinzusatz) wurden die Zellen in Kulturgefäße eingesät. Der erste Mediumwechsel nach kräftiger Spülung mit Earle'scher Lösung zur Selektion der bereits festhaftenden Makrophagen erfolgte nach 20 Min.; weitere folgten nach 24 Std., 4 und 7 Tagen, danach wöchentlich.

Mit nur 10% Serumanteil am Medium und erstem Mediumwechsel erst am 3. Tag nach dem Ansatz bildete sich ein Zellrasen fibroblastischer Peritoneal-Zellen aus, der die Makrophagen vollständig verdrängte.

3.1.3.2 Verwendete Zell-Linien

Die benutzten Zell-Linien sowie die verwendeten Nährmedien sind in Tabelle 4 aufgeführt.

3.1.3.3 Haltung und Vermehrung der Zellkulturen

Die Züchtung erfolgte in Glasflaschen unterschiedlicher Größe und zur fluoreszenzoptischen Auswertung in LEIGHTON-Röhrchen (LT) auf Deckgläschen von 10 x 50 mm Kantenlänge.

Tabelle 4: Zur Züchtung von Borna-Virus verwendete
Zell-Linien

<u>SPECIES</u>	<u>ZELLSTAMM</u>	<u>ANZUCHTMEDIUM</u>	<u>ERHALTUNGSMEDIUM</u>
<u>Hamster</u>	BHK ₂₁	Hanks"neu"+1o%KS	L15+5%KS
<u>Hund</u>	MDCK	L15+5%FKS	dto.
<u>Kaninchen</u>	RK ₁₃ ⁺⁾	TC199+1o%FKS	TC199+5%FKS
	Ma ₁₁₁	MEM+1o%FKS+1o%LA	MEM+5%FKS+1o%LA
<u>Affe</u>	CV ₁	MEM+1o%FKS	MEM+5%FKS
	Vero	Hanks+1o%KS	L15+5%KS
	Rita	MEM+1o%KS	MEM+5%KS
	MS	Hanks"neu"+1o%KS	L15+5%KS
<u>Mensch</u>	HeLa	MEM+1o%FKS	MEM+5%FKS
<u>Mosquito</u>	Aëdes	M-M	dto.

Regelmäßiger Zusatz zu allen Medien:

100 I.E. Penicillin/ml, 100 µg Streptomycin/ml und
1,5% Phenolrot (in 0,1%iger Lösung).

Erläuterungen zu Tabelle 3 und 4:

KS = Kälberserum
 FKS = foetales Kälberserum
 LA = hydrolisiertes Lact-Albumin (in 0,5%iger Lösung)
 L15 = Leibovitz-Medium Nr. 15 (LEIBOVITZ, 1963)
 MEM = Earle's Minimal Essential Medium
 M-M = Medium nach JENTSCH (1974)
 RAF = Rinderamnionflüssigkeit
 TC199 = TC-Medium 199 (Fa. DIFCO)
 +) = RK₁₃-Zellen unterschiedlicher Herkunft

Zum Teil wurden die Zellkulturen subkultiviert. Nach Ablösung der Zellen von der Glaswand mit Saline-Trypsin-Versene-Lösung (MARCUS und Mitarb., 1956), Zentrifugation (5 Min. bei 500 g) und gründlicher Resuspendierung des Zellsediments in wenig Medium wurde die neuerliche Einsaat in einem Teilungsverhältnis von 1:2 bis 1:3 vorgenommen. Sobald sich ein dichter Zellrasen ausgebildet hatte wurde bei sämtlichen Kulturen das Anzucht- durch Erhaltungsmedium ersetzt (vgl. Tabellen 3 und 4).

3.1.4 Immunofluoreszenz

3.1.4.1 Immunseren

Die zur Konjugatherstellung verwendeten Immunseren stammten von Kaninchen, die einmal intracerebral bzw. mehrmals subkutan mit Borna-Virus (Gehirn- oder Zellkulturmaterial) infiziert worden waren. Gut eigneten sich Seren, die in der KBR (MAYR und DANNER, 1972a) Antikörpertiter über 1:32 aufwiesen.

3.1.4.2 Konjugatherstellung

Die Konjugatherstellung erfolgte nach den Angaben von RESSANG und DEN BOER (1967).

Aus den Immunseren wurden die Immunglobuline durch Fällung mit Ammoniumsulfat und anschließender Chromatographie an DEAE-Zellulose (SERVA, Heidelberg) gewonnen. Nach der Konjugierung mit Fluorescein-Isothiocyant (FITC, SERVA) erfolgte die Reinigung von überschüssigem FITC durch Gelfiltration mit Sephadex G-50 (PHARMACIA, Uppsala) mit anschließender Adsorption an Aceton-extrahiertes Schweineleberpulver (SCHNEIDER, 1964) und hochtouriger Zentrifugation (30 Min. bei 20 000 g).

3.1.4.3 Färbung der Zellkulturen zur fluoreszenz-serologischen Auswertung

Die in LEIGHTON-Röhrchen gezüchteten Deckgläschenkulturen wurden nach mehrmaliger gründlicher Spülung mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH 7,4) 10 Min. bei Zimmertemperatur in Aceton p.A. fixiert, luftgetrocknet, nach kurzer Benetzung mit PBS mit Konjugat beschickt und 40 Min. in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Nach zwei abschließenden Waschvorgängen in PBS von je 5 Min. Dauer erfolgte die Einbettung der Präparate in carbonatgepuffertem Glycerin (pH 7,8). Bis zur Auswertung wurden sie bei 4°C dunkel aufbewahrt.

3.1.4.4 Optische Ausrüstung

Zur Auswertung der Präparate stand ein LEITZ-Mikroskop "Ortholux" mit Auflichteinrichtung und der Quecksilberhöchstdrucklampe HBO 200 W als Strahlungsquelle zur Verfügung. Die Filterkombination (LEITZ) setzte sich aus dem Erregerfilter KP 500 in Verbindung mit 4 mm BG 38 zur Rotdämpfung und dem Sperrfilter K 510 zusammen.

3.1.4.5 Fluoreszenzserologische Auswertung

Die mikroskopische Betrachtung der gefärbten Präparate erfolgte bei 400-facher optischer Vergrößerung. Die auftretende Fluoreszenz wurde in Anlehnung an die von DANNER und MAYR (1973) beschriebenen Erscheinungen bei mit Borna-Virus infizierten Zellkulturen beurteilt.

3.1.5 Virustitration

Falls bei den Versuchen nicht anders angegeben wurden die zur fluoreszenzoptischen Auswertung in LEIGHTON-Röhrchen gezüchteten Zellkulturen bei einer Dichte von mindestens 80% nach der Inokulationsmethode mit 0,2 ml Virusmaterial infiziert, über Nacht bei 37°C inkubiert, anschließend nach gründlicher PBS-Spülung mit frischem Medium beschickt und am 5. Tag nach der Infizierung (p.inf.) ausgewertet (MAYR und DANNER, 1974).

Ausgezählt wurde das Auftreten von "fluoreszierenden Zentren" (fl.Z.); unter diesem Begriff wurden fluoreszierende Einzelzellen und Zellverbände zusammengefaßt. Die Angabe des Virusgehaltes in "Infektiösen Einheiten" (Inf.E.) geht davon aus, daß jedem fl.Z. in der Zellkultur eine Inf.E. des Virusmaterials zuzuordnen ist.

Durchmustert wurde jeweils ein Zehntel der Präparatfläche in mäanderförmig gleichmäßig über die Präparate verteilten Reihen (DANNER und BACHMANN, 1970). Dieses Auswertungsverfahren kann aufgrund routinemäßig durchgeführter Ganzpräparatkontrollen, die nur unwesentliche Abweichungen aufwiesen, als repräsentativ angesehen werden.

3.1.6 Bei der Virusgewinnung verwendete Lösungen

In Versuch 3.2.7 wurde u.a. mit folgenden Lösungen gearbeitet:

1. 0,1 (0,2)M Glycin-Puffer (pH 9,0)

Lösung A: 0,1(0,2)M Glycin in Aqua dest. plus
0,1(0,2)M Natriumchlorid in Aqua. dest.

Lösung B: 0,1n Natronlauge

Puffer : 88,4 (76,8) Teile A plus 11,6 (23,2) Teile B.

2. Saline 10-fach konzentriert

1,3700M Natriumchlorid
0,2680M Kaliumchlorid
0,0959M prim. Natriumphosphat
0,0147M prim. Kaliumphosphat
0,0555M Glucose
+ 0,01% Phenolrot

in Aqua dest.

3. SPGA-Stabilisator (CALNEK und Mitarb., 1972)

0,2180M Saccharose
0,0038M prim. Kaliumphosphat
0,0072M sek. Kaliumphosphat
0,0049M Natriumglutamat
+ 1% Rinderserumalbumin

in Aqua dest.

3.2

VERSUCHE UND ERGEBNISSE

3.2.1

Empfänglichkeit verschiedener Zellkulturen
für Borna-Virus

Zu Beginn der Versuchsreihen mußte untersucht werden, welche Zellarten, neben den bereits bekannten (MAYR und DANNER, 1972a/b, 1974), prinzipiell für Borna-Virus empfänglich sind.

Hierzu wurden von den in den Tabellen 3 und 4 aufgeführten Primärzellen und Zell-Linien je 4 LEIGHTON-Röhrchen angelegt, nach Ausbildung eines Zellrasens mit je 0,2 ml Borna-Gehirnvirus pro LT inokuliert, nach ca. 12 bis 24 Std. mit frischem Medium beschickt und zwischen dem 5. und 14. Tag p.inf. fluoreszenzserologisch ausgewertet. Nicht infizierte Kontrollkulturen liefen parallel.

Als empfänglich galten die Zellarten, bei denen in mindestens einem Präparat Zellen mit typischer Borna-Fluoreszenz nachweisbar waren, gleichgültig in welcher Quantität. Nur wenn bei vollständiger Durchmusterung aller vier infizierten Präparate selbst nach 14 Tagen p.inf. keine fluoreszierende Zelle gefunden werden konnte, wurde die entsprechende Zellart als nicht empfänglich bezeichnet. Auch die Kontrollpräparate wurden vollständig abgesucht.

Ergebnis:

Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in den Tabellen 5 und 6 zusammengestellt.

Mit Ausnahme foetaler Kälbernierenzellen und der immunkompetenten Zellarten vom Kaninchen erwiesen sich alle untersuchten Primärzellen als empfänglich für Borna-Virus.

Tabelle 6: E m p f ä n g l i c h k e i t v o n Z e l l - L i n i e n
 f ü r B o r n a - V i r u s

<u>SPECIES</u>	<u>ZELLART</u>	<u>EMPFÄNGLICHKEIT</u>
<u>Hamster</u>	BHK ₂₁	+
<u>Hund</u>	MDCK	+
<u>Kaninchen</u>	RK ₁₃	+
	Ma ₁₁₁	+
<u>Affe</u>	CV ₁	+
	Vero	+
	Rita	+
	MS	-
<u>Mensch</u>	HeLa	-
<u>Mosquito</u>	Aedes aegypti	-
	Aedes albopictus	-

Von den Zell-Linien waren MS- und HeLa-Zellen sowie die beiden Aëdes-Linien nicht für Borna-Virus empfänglich. Keine der nicht infizierten Kontrollkulturen zeigte Fluoreszenz.

3.2.2 Eignung einiger Zellarten für den quantitativen Nachweis von Borna-Virus

Bereits aus den genannten orientierenden Versuchen ging die unterschiedliche Eignung der Borna-empfindlichen Zellen für den Nachweis von Borna-Virus deutlich hervor. Dieses drückte sich vor allem in der Quantität fluoreszierender Zellen und der Brillanz der Fluoreszenz aus. Die besonders geeignet erscheinenden Zellarten wurden nun auf ihre Verwendbarkeit für einen empfindlichen Virusnachweis sowie für Routine-Titrationen überprüft.

Die Eignungskriterien waren folgende:

1. Anzahl der fluoreszierenden Zentren am 5. Tag p.inf.,
2. Brillanz der Fluoreszenz,
3. Größe und Deutlichkeit der fluoreszierenden Zentren,
4. Haltbarkeit der Kultur.

Da nicht alle Zellarten gleichzeitig zur Verfügung standen, dienten in jedem Versuchsansatz CV₁-Zellen als Bezugssystem für die vergleichende quantitative Auswertung. CV₁-Zellen hatten sich schon in mehreren Vorversuchen bei der Virustitration bewährt.

Von den in den Tabellen 7 und 8 aufgeführten Zellarten wurden wiederum 4 LT angelegt, mit je 0,2 ml Gehirnvirus infiziert und am 5. Tag p.inf. mittels Immunofluoreszenzmethode untersucht.

Ergebnis:

Das Versuchsergebnis ist in Abbildung 1 wiedergegeben. Sowohl bei den Primärzellen als auch den Zell-Linien schwankte die Empfindlichkeit für Borna-Virus beträchtlich. Die Zell-Linien erwiesen sich allerdings durch den geringeren Aufwand bei der Züchtung, die Gleichmäßigkeit der Kulturansätze und die deutliche Ausbildung der fluoreszierenden Zentren als den Primärkulturen überlegen. Gute Eignung zeigten hierbei die CV₁- und RK₁₃-Zellen. Die Neigung der letzteren zur Zellhaufenbildung mit Sekundäraussaat durch abschwimmende infizierte Zellen beeinträchtigte ihre Eignung nicht wesentlich.

Aufgrund ihrer großen Empfindlichkeit wurden die RK₁₃-Zellen in den meisten weiteren Versuchen zur Titration herangezogen.

Bei den Primärkulturen wird das Auszählen der fluoreszierenden Zentren durch das oft weit verzweigte Zellwachstum und die undeutliche Plaquebildung erschwert. Innerhalb der einzelnen Primärzellarten und ihrer Subkulturen traten je nach Kulturansatz starke Schwankungen der Empfindlichkeit auf. Die FLG- und BKG-Zellen erwiesen sich, zwar nicht für routinemäßige, aber für vergleichende Titrationsen verwendbar.

Die Tabellen 7 und 8 geben einen zusammenfassenden Überblick über die Eignung der getesteten Zellarten für den fluoreszenzserologischen Nachweis von Borna-Virus.

Tabelle 7: Eignung von Primärzellen für den fluoreszenzserologischen Nachweis von Borna-Virus

ZELLART	EMPFINDLICHKEIT (bezogen auf CV ₁ = 100%)	BRILLANZ der FLUORESZENZ	AUSBILDUNG der FLUORESZIERENDEN ZENTREN	HALTBARKEIT der KULTUR	SONSTIGES
<u>FLG</u> Pk.	100%	+++	undeutlich	gut	Schwankungen je nach Ansatz
1.Sk.	23%	+++	"-	gut	
2.Sk.	7%	+++	"-	gut	
3.Sk.	65%	+++	"-	gut	
4.Sk.	0%	-	-	schlecht	
<u>BKG</u> Pk.	180%	+++	undeutlich	gut	Schwankungen je nach Ansatz
1.Sk.	28%	+++	"-	gut	
2.Sk.	110%	+++	"-	gut	
<u>GHE</u> Pk.	25%	++	undeutlich	mäßig	Schwankungen je nach Ansatz
Pk.	57%	++	"-	mäßig	
1.Sk.	180%	+++	"-	mäßig	

Tabelle 7: Fortsetzung

<u>FLN</u> Pk.	80%	+++	deutlich, rasch	gut	-
<u>BKN</u> Pk.	60%	+++	deutlich, rasch	mittel	-
<u>SNE</u> 2.Sk.	17%	+++	deutlich	mittel	-
<u>FHE</u> Pk.	91%	+	undeutlich	schlecht	-
<u>KH</u> Pk.	52%	++	vorwiegend Einzelzellen	mittel	-

Erläuterungen:

FLG = foetale Lammgehirnzellen SNE = foetale Schweinehirnzellen
 BKG = Babykaninchen-Gehirnzellen FHE = Hühnerembryonen-Fibroblasten
 GHE = Hühnerembryonen-Gehirnzellen KH = Kälberhodenzellen
 FLN = foetale Lammnierenzellen Pk. = Primärkultur
 BKN = Babykaninchen-Nierenzellen Sk. = Subkultur

Tabelle 8: Eignung von Zell-Linien für den fluoreszenzserologischen Nachweis von Borna-Virus

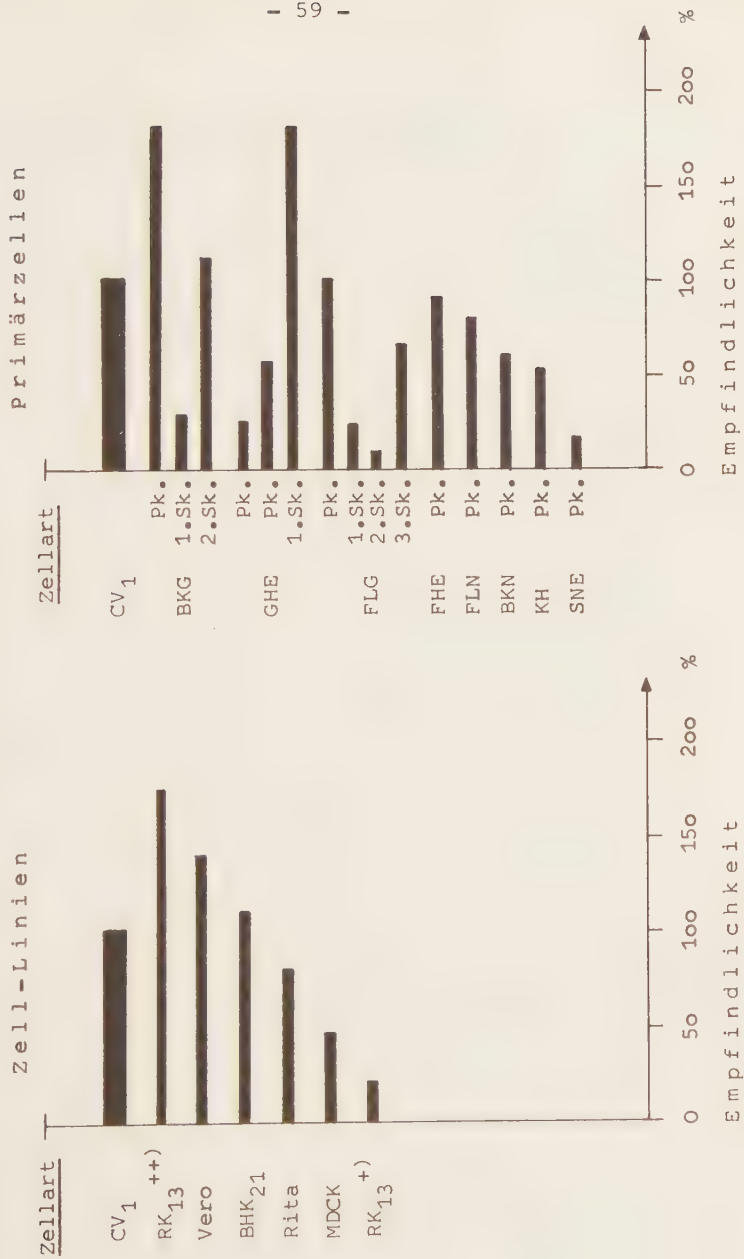
ZELLART	EMPFINDLICHKEIT (bezogen auf $CV_1 \stackrel{!}{=} 100\%$)	BRILLANZ der FLUORESZENZ	AUSBILDUNG der FLUORESZIERENDEN ZENTREN	HALTBARKEIT der KULTUR	SONSTIGES
CV_1	100%	+++	deutlich, rasch	sehr gut	-
$RK_{13}^{++})$	175%	+++	deutlich, rasch	sehr gut	geringe Sekundäraussaat über abgelöste Zellen
$RK_{13}^{+})$	20%	++	langsam	sehr gut	
Vero	140%	+	deutlich	mittel	abnehmende Intensität der Fluoreszenz im Verlauf der Inkubierung
Rita	80%	++	deutlich	mittel	
BHK ₂₁	110%	+	undeutlich	mäßig	
MDCK	45%	+	vorwiegend Einzelzellen	mittel	

Erläuterungen:

+) = RK_{13} -Zellen gezüchtet mit Earle's MEM

++) = RK_{13} -Zellen gezüchtet mit TC-Medium 199

Abb. 1: Vergleichende Darstellung der Empfindlichkeit verschiedener Zellarten für Borna-Virus



3.2.3 Vergleich der Empfindlichkeit von Kaninchen und Zellkulturen für Borna-Virus

Zur Untersuchung dieser Frage wurde Borna-Kulturvirus parallel in 6 Wochen alten Kaninchen (0,2 ml/Kaninchen i.cer.) sowie in CV₁- und BKG-Kulturen (0,2 ml/LT) verimpft. Das Virus wurde in den Zehner-Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-6} eingesetzt. Je Versuchsgruppe und Verdünnungsstufe standen vier Reagenten zur Verfügung.

Für den Nachweis der Infektiosität galten bei den Kaninchen folgende Kriterien:

1. Typische Erkrankung nach einer Inkubationszeit von mindestens 2-3 Wochen,
2. Antigen- oder Virusnachweis aus den Gehirnen der gestorbenen oder in moribundem Zustand getöteten Tiere,
3. histologische Veränderungen im Gehirn,
4. Antikörperreaktion, gemessen an komplementbindenden Serumantikörpern (MAYR und DANNER, 1972a).

Die Zellkulturen wurden nach der Inokulation über 18 Tage mit zwischenzeitlichem Mediumwechsel gehalten. Die Auswertung wurde durch den qualitativen Antigennachweis (IFT) in den Präparaten geführt, d.h. diese wurden bis zum Auffinden spezifischer Fluoreszenz durchmustert und dann als positiv bezeichnet. War trotz vollständigem Absuchen keine fluoreszierende Zelle im Präparat zu finden, galt dieses als negativ.

Ergebnis:

Nach den aufgeführten Charakteristika besaß das Virusmaterial folgende Infektiosität:

für Kaninchen - $10^{5,0}$ ID₅₀ (LD₅₀) pro 0,2 ml,

für CV₁-Zellen - $10^{4,0}$ ID₅₀ pro 0,2 ml,

für BKG-Zellen - $10^{4,25}$ ID₅₀ pro 0,2 ml.

Die verwendeten Zellkulturen erwiesen sich somit als ca. 5- bis 10-fach weniger empfindlich für Borna-Virus als Kaninchen nach intracerebraler Infizierung.

3.2.4 Titration von Borna-Virus in Zellkulturen

Der Versuch 3.2.2 hatte gezeigt, daß sich CV₁- und RK₁₃-Zellen für den fluoreszenzoptischen Nachweis von Borna-Virus besonders gut eignen. An CV₁- und RK₁₃-Zellen sollte deswegen studiert werden, welche Bedingungen für eine rountinemäßige Titration von Borna-Virus beachtet werden müssen.

Folgende Punkte waren zu klären:

1. Der Zeitpunkt, zu welchem alle primär infizierten Zellen Fluoreszenz zeigen und eine korrekte Auszählung möglich ist.
2. Ob eine Virusausbreitung über das Kulturmedium evtl. zum Entstehen sekundärer fluoreszierender Zentren und damit zur Verfälschung des Titrationsergebnisses führen könnte.
3. Der Einfluß des Alters der Zellkulturen auf das Titrationsergebnis.
4. Der Einfluß der Infizierungstechnik auf das Titrationsergebnis.

3.2.4.1 Auftreten und zeitliche Entwicklung von fluoreszierenden Zentren

In diesem Versuch sollte geklärt werden, welcher Zeitpunkt für eine korrekte Auszählung fluoreszierender Zentren am geeignetsten ist, und ob eine Virus-Sekundärausbreitung übers Medium zur Verfälschung des Titrationsergebnisses führen könnte.

Hierzu wurden CV₁- und RK₁₃-Zellen in LEIGHTON-Röhrchen gezüchtet und bei einer Zellrasendichte von mindestens 70% mit je 0,4 ml Borna-Kulturvirus infiziert (Adsorptionsmethode). Nach einer Adsorptionszeit von 4 Stdn. bei 37°C wurden die Kulturen zweimal gründlich mit Earle'scher Lösung gespült, um nicht adsorbiertes Virus zu entfernen, und mit je 1,5 ml Erhaltungsmedium beschickt. Bei einem Teil der Kulturen enthielt das Medium einen Tylosezusatz von 0,75% zur Hemmung der Virus-Sekundärausbreitung übers Medium (SCHWÖBEL, 1961). Die fluoreszenzserologische Auswertung erfolgte an verschiedenen Tagen p.inf. an jeweils zwei LT pro Zellart und Mediumzusammensetzung über einen Zeitraum von 15 Tagen bei den RK₁₃-Zellkulturen und 19 Tagen bei den CV₁-Zellkulturen.

Ergebnis:

Auftreten und quantitative Entwicklung des Borna-Zellantigens wiesen in beiden Zell-Linien im Prinzip die selben Charakteristika auf, gleichgültig, ob im Kulturmedium Tylose enthalten war oder nicht.

Erstmalig ließ sich Zellantigen bereits am 2. Tag p.inf. in einzelnen Zellen nachweisen; allerdings war die Fluoreszenz zum Teil sehr schwer zu erkennen. Ab dem 3. (RK₁₃-Zellen) bzw. 4. Tag (CV₁-Zellen) bildeten sich fluoreszierende Mikroplaques aus. Die Zahl der fluoreszierenden Einzelzellen bzw. Mikroplaques (zusammen als fluoreszierende Zentren be-

zeichnet) nahm bis zum 5. Tag p.inf. zu, um sich dann auf gleicher Höhe zu halten. Gegen Ende der Beobachtungszeit sank die Anzahl an fluoreszierenden Zentren (v.a. in den CV₁-Kulturen) mit zunehmender Alterung und beginnender Ablösung der ohne Mediumwechsel gehaltenen Zellen leicht ab. Bei den ohne Tylosezusatz gezüchteten RK₁₃-Zellen lag die Zahl der fluoreszierenden Zentren leicht über dem Wert der unter Tylose gehaltenen Versuchsreihe. Zu diesem Zeitpunkt konnte eine geringfügige Sekundäraussaat durch das Abschilfern einzelner infizierter Zellen beobachtet werden. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 9 und den Abbildungen 2a und 2b zusammengefaßt.

3.2.4.2 Einfluß des Alters von Zellkulturen auf das Titrationsergebnis

Bei der Entwicklung einer Standardmethode für die Titration von Borna-Virus in Zellkulturen mußte weiterhin geprüft werden, ob deren Empfindlichkeit für das Virus von ihrem Alter abhängt.

Zur Klärung dieser Frage wurden RK₁₃-Zellen in LEIGHTON-Röhrchen eingesät und zu verschiedenen Zeitpunkten mit Kulturvirus infiziert:

- bei der Einsaat,
- nach 24 Stunden,
- nach 4 Tagen,
- nach 9 Tagen.

Die fluoreszenzserologische Auswertung erfolgte jeweils am 5. Tag p.inf..

Tabelle 9:

Zeitliche Entwicklung der fluoreszierenden Zentren bei einer Borna-Virusinfektion (mit und ohne Tylosezusatz zum Medium):

in RK₁₃-Zellen:

TAGE p.inf.	FLUORESIZIERENDE ZENTREN/Kultur	
	ohne Tylose	mit Tylose
2	460	330
3	1260	890
4	1620	1470
5	1780	1550
7	1820	1450
10	1700	1090
15	1540	1140

in CV₁-Zellen:

TAGE p.inf.	FLUORESIZIERENDE ZENTREN/Kultur	
	ohne Tylose	mit Tylose
2	35	40
3	270	430
4	565	675
5	900	760
6	900	1050
8	935	960
10	1000	1000
14	880	900
19	750	710

Abb. 2a: Vergleichende Darstellung der zeitlichen Entwicklung fluoreszierender Zentren (mit und ohne Tylosezusatz)

Fluoreszierende Zentren/Kultur

in CV₁-ZELLEN

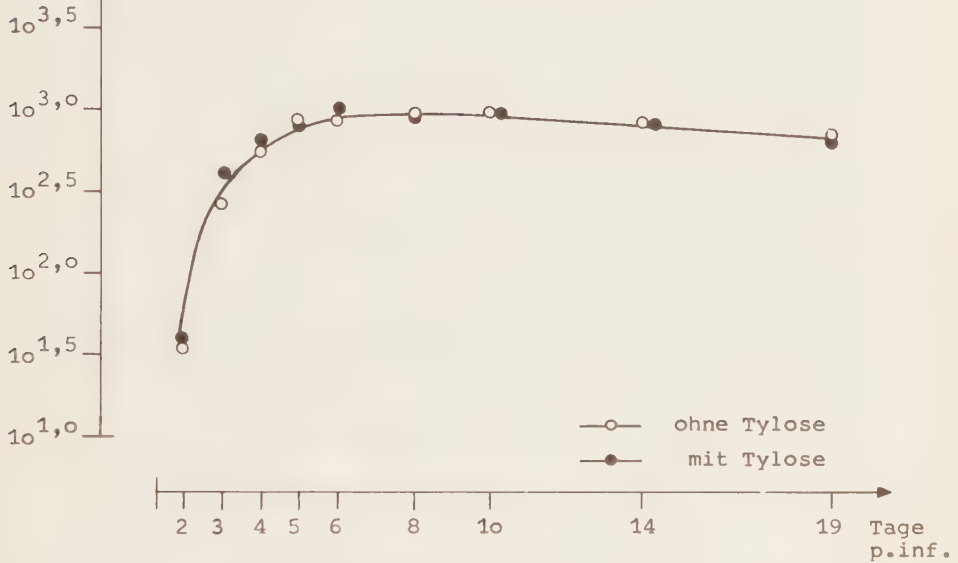
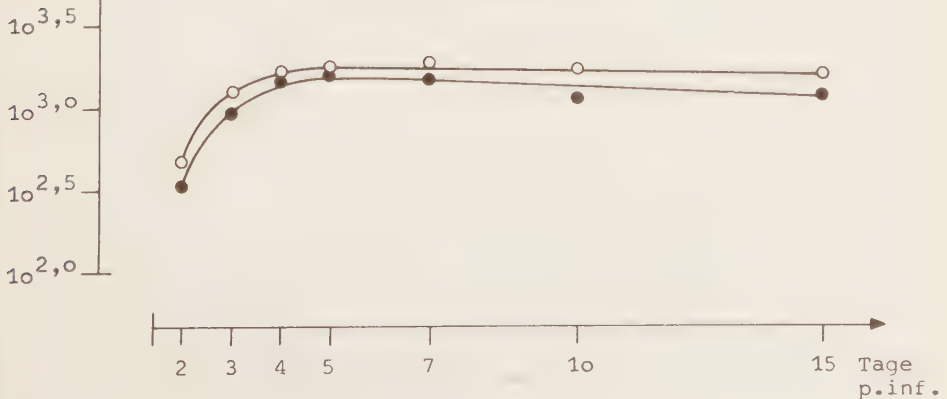


Abb. 2b: Vergleichende Darstellung der zeitlichen Entwicklung fluoreszierender Zentren (mit und ohne Tylosezusatz)

Fluoreszierende Zentren/Kultur

in RK₁₃-ZELLEN



Ergebnis:

Vor allem die gleich bei der Einsaat, in geringerem Umfang aber auch die nach einem Tag infizierten Zellen wiesen große Schwankungen in der Zahl der Zellen pro fluoreszierendes Zentrum auf und erschwerten dadurch eine gleichmäßige Auswertung; der Wert von 5100 fl.Z./LT bei den sofort infizierten Zellen konnte deshalb nur geschätzt werden.

Andererseits war das Wachstum der fluoreszierenden Zentren bei den 9 Tage alten Kulturen stark verzögert; die Auszählung der überwiegenden Einzelzellen gestaltete sich sehr mühsam.

Wurden die RK₁₃-Zellkulturen 4 Tage nach dem Ansatz infiziert, zeigten sie in gleichmäßiger Verteilung deutliche fluoreszierende Zentren mit 1 bis 4 fluoreszenzpositiven Zellen und waren am besten für die Virustitration geeignet.

Die Titrationsergebnisse gibt die Tabelle 10 wieder.

3.2.4.3 Einfluß der Infizierungstechnik auf das Titrationsergebnis

Routinemäßige Titrationsen von Borna-Virus sollten technisch möglichst einfach und dabei ausreichend empfindlich sein. Hierzu gehörten auch Kenntnisse über den Einfluß verschiedener Infizierungstechniken:

1. Adsorptions- oder Inokulationsmethode,
2. Infizierungstemperatur,
3. Infizierungsdauer.

Dazu wurden in LEIGHTON-Röhrchen gezüchtete RK₁₃-Zellen mit je 0,2 ml Kulturvirus infiziert, und zwar ein Teil nach der Adsorptionsmethode und der andere nach der Inokulationsmethode. Anschließend erfolgte eine Unterteilung in jeweils

Tabelle 10: Eignung von RK₁₃-Zellkulturen unterschiedlichen Alters für Titrations von Bornavirus

ZELLALTER bei Infizierung	FLUORESZIERENDE ZENTREN/LT	GRÖSSE der fluoresz. Zentren	AUSWERTUNG	EIGNUNG für TITRATION
bei Einsaat	ca. 5100	stark schwankend	undeutlich	-
1 Tag (30% dicht)	3440	schwankend	etwas undeutlich	++
4 Tage (100% dicht)	3420	gleichmäßig (1-4 Zellen)	sehr deutlich	+++
9 Tage (100% dicht)	2520	v.a. Einzelzellen	undeutlich	+

drei Temperaturgruppen: 4°C - 20°C - 37°C.

Nach 30 Min., 1 Std., 2, 4, 8 und 24 Stdn. wurden je zwei Deckgläschenkulturen pro Versuchsgruppe mit einer sterilen Pinzette entnommen, zur Entfernung des nicht adsorbierten Virus mehrmals gründlich in Earle'scher Lösung gespült und in neuen LEIGHTON-Röhrchen bis zur Auswertung am 5. Tag p.inf. bei 37°C gehalten.

Ergebnis:

Generell erbrachten alle Versuchsgruppen nach spätestens 24 Stdn. Infizierungsdauer die gleichen Titrationsergebnisse. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Infizierungsmethoden traten nur als Verzögerungen innerhalb der ersten Stunden auf. Während mit der Adsorptionsmethode bereits nach 30 Min. unabhängig von der Temperatur ca. 60% Virus adsorbiert waren, betrug die adsorbierte Virusmenge mit der Inokulationsmethode zum gleichen Zeitpunkt erst ca. 30%. Nach vier Stunden war der Unterschied innerhalb der bei 37°C und 20°C gehaltenen Versuchsgruppen jedoch ausgeglichen und gleichzeitig der durchschnittliche Endpunkt (am deutlichsten bei 37°C) erreicht. Bei 4°C schien die Aufnahme von Virus bis zur 24. Std. p.inf. in geringem Maße kontinuierlich zuzunehmen.

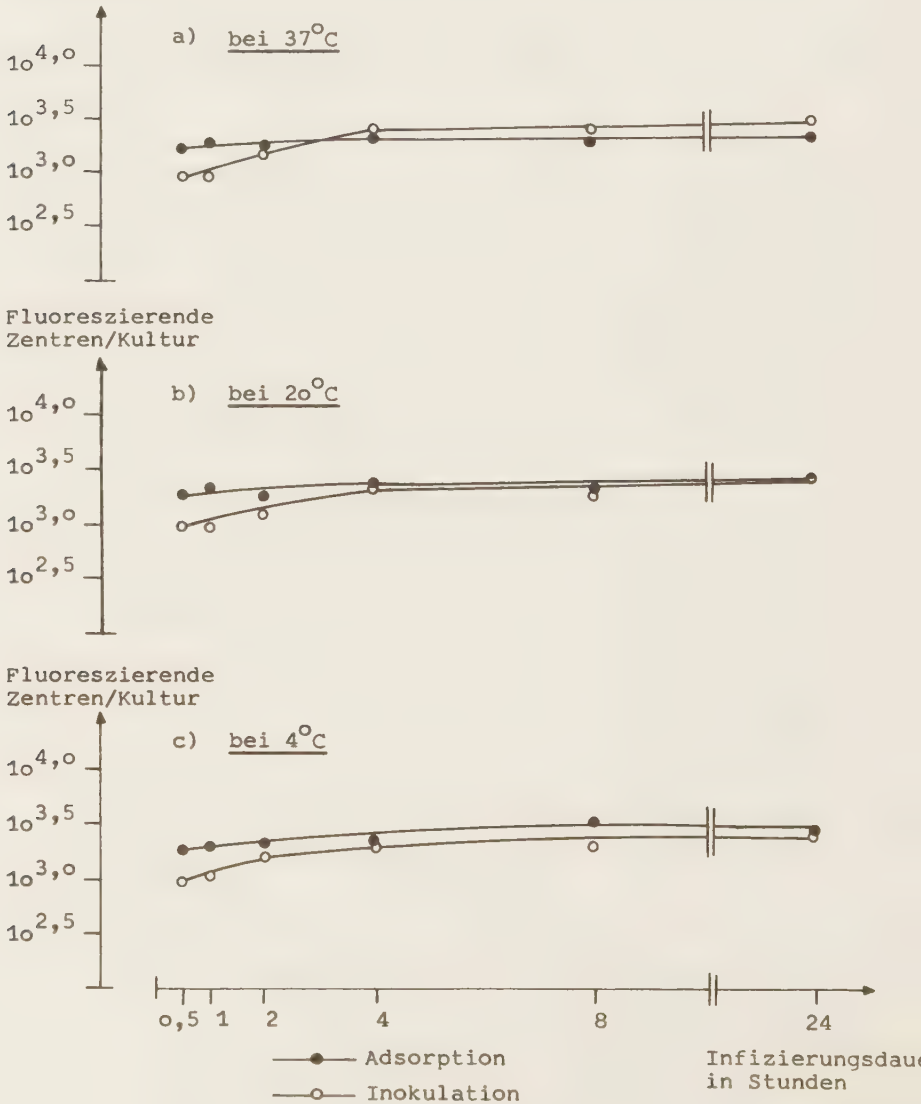
Diese Ergebnisse sind in Tabelle 11 und in den Abbildungen 3a, 3b und 3c dargestellt.

Tabelle 11: Ergebnis einer Borna-Virus-Titration in RK₁₃-Zellen bei verschiedenen Infizierungstechniken

TEMPERATUR	INFIZIERUNGS- TECHNIK	Fluoreszierende Zentren/LT am <u>5.</u> Tag p.inf. bei einer INFIZIERUNGSDAUER von:					
		0,5 h	1 h	2 h	4 h	8 h	24 h
4°C	Adsorption	1820	1970	2100	2270	3400	2950
	Inokulation	960	1080	1600	1970	2030	2500
20°C	Adsorption	1910	2140	1730	2450	2120	2610
	Inokulation	980	960	1160	2100	2060	2810
37°C	Adsorption	1640	1830	1760	1920	1840	2050
	Inokulation	910	940	1480	2570	2430	2940

Abb. 3: Vergleichende Borna-Virus-Titration
in RK-13-Zellen bei unterschiedlicher
Dauer, Temperatur und Technik
der Infizierung:

Fluoreszierende
Zentren/Kultur



3.2.5 Ausbreitung und Vermehrung von Borna-Virus in Zellkulturen

Zur Laboratoriumsarbeit mit dem Borna-Virus benötigt man ein System, in dem das Virus gut und rasch vermehrt werden kann. Von den Ergebnissen der vorangegangenen Versuche her war die besondere Sensibilität von CV₁-Zellen und primärer BKG- und FLG-Kulturen bekannt. Um den zeitlichen Verlauf der Virusausbreitung und Virusvermehrung in vitro zu studieren, wurden an ihnen folgende Untersuchungen parallel durchgeführt:

1. Bestimmung der Virusausbreitung

Die Virusausbreitung in der Zellkultur läßt sich anhand der Anzahl fluoreszierender Zentren (Plaqueszahl) und der Geschwindigkeit mit welcher sich Virus von Zelle zu Zelle ausbreitet (Plaqueswachstum) verfolgen. Die zeitliche Entwicklung der Plaqueszahl wurde bereits in Versuch 3.2.4.1 geklärt. Hier sollte jetzt ergänzend das Plaqueswachstum untersucht werden.

2. Bestimmung der Virusvermehrung

Hierzu wurde der zeitliche Ablauf der Neusynthese von infektiösem Borna-Virus in den Kulturen studiert (Vermehrungskurve).

Gleichzeitig konnte bei den verschiedenen Zellarten untersucht werden, ob Virusausbreitung und -vermehrung durch den Ernährungszustand der Kulturen beeinflußt werden.

3.2.5.1 Ausbreitung und Vermehrung von Borna-Virus
 in CV₁-Zellen

Virusausbreitung

Dichte CV₁-Zellkulturen in LEIGHTON-Röhrchen wurden mit je 0,2 ml Gehirnvirusmaterial ($\approx 10^{3,36}$ Inf.E.) infiziert und in Abständen über einen Zeitraum von vier Wochen fluoreszenzserologisch ausgewertet. Bei einem Teil der Kulturen wurde am 7., 14. und 21. Tag p.inf. ein Mediumwechsel durchgeführt.

Durch das Konfluieren dichter liegender Mikroplaques war eine korrekte Zählung der Zellen pro fluoreszierendes Zentrum bei den Kulturen mit Mediumwechsel nur bis zum 14. Tag, bei denen ohne bis zum 21. Tag p.inf. möglich.

Ergebnis:

Die am 2. Tag p.inf. in einzelnen Zellen auftretende schwache Fluoreszenz hatte granuläre Form und war ausschließlich kernständig. Ab dem 4. Tag zeigten einige Zellen zusätzlich schwache Plasmafluoreszenz, gleichzeitig hatten bereits erste Nachbarzellen beginnende Kernfluoreszenz - es bildeten sich fluoreszierende Mikroplaques aus. Die durchschnittliche Plaquegröße nahm bei den mit regelmäßigem Mediumwechsel gehaltenen Kulturen ab dem 3. Tag p.inf. nahezu linear zu. Am 21. Tag p.inf. bestanden die Mikroplaques hier durchschnittlich aus 200 fluoreszenzpositiven Zellen. Im Gegensatz dazu breitete sich die Fluoreszenz in den ohne Mediumwechsel gezüchteten Kulturen ab dem 7. Tag p.inf. langsamer aus; die durchschnittliche Plaquegröße betrug dementsprechend am 21. Tag p.inf. nur ein Achtel der ersteren Gruppe.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 und Abbildung 4 zusammengefaßt.

Virusvermehrung

In kleinen Kulturflaschen gezüchtete CV₁-Kulturen (jeweils ca. 3 Mio. Zellen) wurden mit je 1,0 ml Gehirnvirusmaterial ($\hat{=}$ $10^{4,06}$ Inf.E.) infiziert. Parallel zu den LEIGHTON-Röhrchen erfolgte auch hier bei einem Teil der Zellen wöchentlich Mediumwechsel. In bestimmten Abständen wurden einzelne Flaschen bei -70°C eingefroren und später zur gleichzeitigen Titration in RK₁₃-Zellen nach der Standardmethode aufgeschlossen und verimpft.

Ergebnis:

Infektiöses Virus konnte erstmals am 7. Tag p.inf. nachgewiesen werden. Der Virusgehalt stieg dann parallel zum Plaqueswachstum an, und zwar bei den wöchentlich frisch ernährten Kulturen bis zum Ende der Beobachtungszeit. Hiergegenüber sank die Virusmenge in den nicht gewechselten Kulturen schon ab dem 14. Tag wieder ab und unterschritt am 28. Tag p.inf. bereits die Nachweisgrenze.

Diese Ergebnisse sind in Tabelle 13 und Abbildung 4 dargestellt.

Regelmäßige Untersuchungen des Kulturmediums ergaben keinen Anhaltspunkt dafür, daß infektiöses Virus von den Zellen ins Medium abgegeben wird.

3.2.5.2 Ausbreitung und Vermehrung von Borna-Virus in BKG-Zellen

Die Versuchsanordnung für die Bestimmung der Virusausbreitung und -vermehrung entsprach im wesentlichen dem Versuch

3.2.5.1. Die Auswertung erfolgte wöchentlich, außerdem am 4. Tag p.inf.; auch hier war wegen konfluierender Plaques eine exakte Zählung der Zellen pro Plaque nur bis zum 14. Tag p.inf. möglich.

Tabelle 12: Ausbreitung von Borna-Virus
in CV₁-Zellkulturen (LT)

TAGE p.inf.	FLUORESZIERENDE ZENTREN/Kultur		Ø ZELLZAHL/ fluoresz.Z.	
	ohne MW	mit MW	ohne MW	mit MW
3	470	-	1,0	-
4	1680	-	1,8	-
5	2420	-	2,5	-
7	3100	-	4,8	-
10	2040	1820	6,5	16,0
14	2200	1580	9,5	37,0
17	2040	2000	17,0	100
21	2000	2100	25,0	200

Tabelle 13: Vermehrung von Borna-Virus
in CV₁-Zellkulturen (Flaschen)

TAGE p.inf.	INFEKTIOSITÄT Inf.E./Kultur	
	ohne MW	mit MW
4	$< 10^{2,243}$	-
7	$10^{3,658}$	-
14	$10^{4,022}$	$10^{4,896}$
21	$10^{3,197}$	$10^{5,042}$
28	$< 10^{2,243}$	$10^{5,532}$

Erläuterung:

MW = Mediumwechsel

Abb. 4:

Darstellung der Ausbreitung und Vermehrung
von Borna-Virus in CV₁-ZELLEN



Ergebnis:

Virusausbreitung

Bereits am 4. Tag p.inf. waren alle primär infizierten Zellen und auch schon vereinzelt erste Nachbarzellen fluoreszenzpositiv. Die Weitergabe von Borna-Zellantigenen an die umgebenden Zellen nahm stetig zu, so daß die fluoreszierenden Zentren 4 Wochen p.inf. im Durchschnitt aus 41 Zellen bestanden. Ein Unterschied zwischen den mit bzw. ohne Mediumwechsel gehaltenen Kulturen bestand nicht.

Virusvermehrung

Infektiöses Virus ließ sich schon am 4. Tag p.inf. aus den Kulturzellen extrahieren. Ohne Mediumwechsel lag der Höhepunkt der Virusvermehrung am 21. Tag p.inf., danach nahm die Infektiosität in den Kulturen langsam ab. In der Parallelreihe war eine stetige Steigerung der Virusvermehrung bis zum Ende der Beobachtungszeit zu verzeichnen.

In den Tabellen 14 und 15 sowie in der Abbildung 5 sind diese Ergebnisse aufgeführt.

3.2.5.3 Ausbreitung und Vermehrung von Borna-Virus in FLG-Zellen

Bei der Verfolgung der Ausbreitung und Vermehrung von Borna-Virus in FLG-Kulturen wurde die Versuchsanordnung 3.2.5.1 übernommen, das Medium aber generell wöchentlich erneuert. Die Auswertung erfolgte in 7-tägigem Abstand. Eine exakte Größenbestimmung der Plaques war hier bis zum 21. Tag p.inf. möglich.

Tabelle 14: Ausbreitung von Borna-Virus
in BKG-Zellkulturen (LT)

TAGE p.inf.	FLUORESZIERENDE ZENTREN/Kultur		Ø ZELLZAHL/ fluoresz.Z.	
	ohne MW	mit MW	ohne MW	mit MW
4	1710	-	1,6	-
7	2000	-	2,1	-
14	1790	2020	5,2	5,5
21	1895	2020	16,0	16,8
28	1895	2020	41,0	41,0

Tabelle 15: Vermehrung von Borna-Virus
in BKG-Zellkulturen (Flaschen)

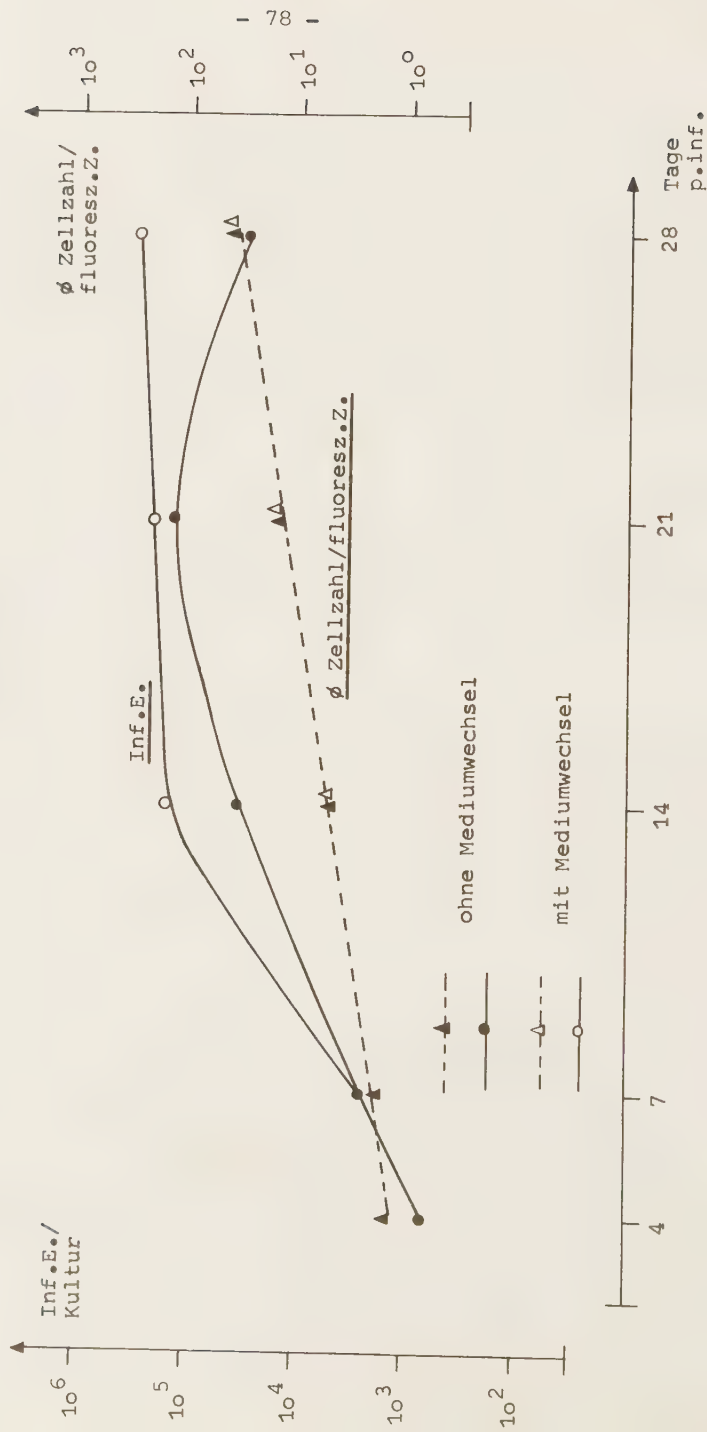
TAGE p.inf.	INFEKTIOSITÄT Inf.E./Kultur	
	ohne MW	mit MW
4	$10^{2,845}$	-
7	$10^{3,389}$	-
14	$10^{4,544}$	$10^{5,190}$
21	$10^{5,146}$	$10^{5,322}$
28	$10^{4,477}$	$10^{5,505}$

Erläuterung:

MW = Mediumwechsel

Abb. 5:

Darstellung der Ausbreitung und Vermehrung
von Borna-Virus in BKG-ZELLEN



Ergebnis:

Virusausbreitung und -vermehrung nahmen bis zum Ende der Beobachtungszeit stetig zu. Die Plaques umfaßten nach 4 Wochen 25 bis 26 fluoreszenzpositive Zellen. Die Virusausbeute lag zu diesem Zeitpunkt mit $10^{4,64}$ Inf.E. pro Flasche am höchsten.

Diese Ergebnisse sind in den Tabellen 16 und 17 und in Abbildung 6 dargestellt.

3.2.6 Eignung verschiedener Zellkulturen für
die Produktion von Borna-Virus

Um die Produktivität verschiedener Zellkulturen zu vergleichen, werden diese üblicherweise mit einer Multiplizität > 1 infiziert; so wird jede Zelle primär infiziert, und die Virusvermehrung innerhalb der einzelnen Kulturen verläuft synchron.

Bei Borna-Virus war es bisher nicht möglich, diese Multiplizität zu erreichen. Eine Vermehrungskurve kann deshalb nicht auf der gleichzeitigen Virusvermehrung in sämtlichen Kulturzellen basieren, sondern muß die allmähliche Ausbreitung virusinfizierter Zellen berücksichtigen, wobei immer mehr Zellen nacheinander Virus produzieren. Die Produktivität einer Zellkultur für Borna-Virus ist somit

1. von der "Zellproduktivität",
 2. von der Virusausbreitung
- abhängig.

Aus der Größe des Inokulums kann mit diesen Werten errechnet werden, welche Virusmenge die jeweilige Zellart produzieren wird.

Tabelle 16: Ausbreitung von Borna-Virus
in FLG-Zellkulturen (LT)

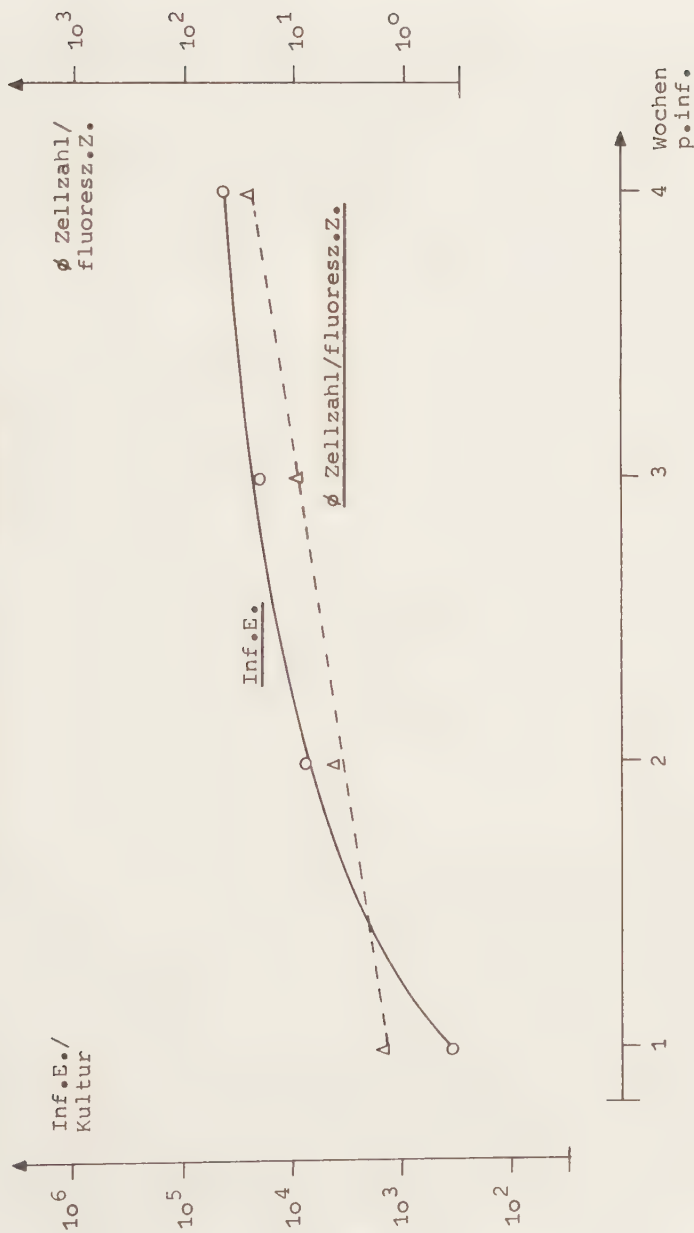
WOCHEN p.inf.	FLUORESZIERENDE ZENTREN/Kultur	Ø ZELLZAHL/ fluoresz.Z.
1	1680	1,5
2	1860	4,3
3	1770	9,4
4	1770	25,0

Tabelle 17: Vermehrung von Borna-Virus
in FLG-Zellkulturen (Flaschen)

WOCHEN p.inf.	INFEKTIOSITÄT Inf.E./Kultur
1	$10^{2,544}$
2	$10^{3,822}$
3	$10^{4,315}$
4	$10^{4,645}$

Abb. 6:

Darstellung der Ausbreitung und Vermehrung
von Borna-Virus in FLG-ZELLEN



Die Virusausbreitung in einigen Zellkulturen wurde bereits in Versuch 3.2.5 untersucht.

In diesem Versuch sollte die Zellproduktivität verschiedener Primärzellen und Zell-Linien zu einem bestimmten Zeitpunkt geklärt werden; dazu mußte die von der Gesamtkultur gebildete Virusmenge zur Zahl der virusproduzierenden Zellen in Beziehung gesetzt werden.

Die Versuchsanordnung entsprach im wesentlichen dem Versuch 3.2.5. Bei einem Teil der Kulturen, die in Tabelle 18 aufgeführt sind, wurde nach der 1. Woche ein Mediumwechsel vorgenommen.

Die Auswertung erfolgte am 14. Tag p.inf.; dieser Termin wurde gewählt, weil sich alle Zellkulturen im allgemeinen gut solange halten, andererseits dem Virus möglichst viel Zeit zur Multiplikation gegeben werden sollte.

Die Zahl der virusproduzierenden Zellen im jeweiligen Kultursystem wurde fluoreszenzserologisch bestimmt. Die Virusmenge in Inf.E. ergab sich aus der Gewinnung parallel angelegter Kulturen und der Feststellung ihres Virusgehaltes durch Titration in RK₁₃-Zellen.

Ergebnis:

Die Ergebnisse im einzelnen sind in Tabelle 18 und Abbildung 7 zusammengestellt.

Während die Zahl der fluoreszenzpositiven Zellen von Zellart zu Zellart nur relativ geringe Unterschiede aufwies (maximal 8-fache Zellzahl), schwankten die aus den Kulturen extrahierten Virusmengen beträchtlich (maximal 150-fache Virusausbeute). Dementsprechend verteilten sich auch die Werte der Zellproduktivität zwischen $10^{-2,26}$ (Vero-Zellen ohne Mediumwechsel) und $10^{0,72}$ Inf.E. pro fluoreszenzpositive Zelle (BKG-Zellen mit Mediumwechsel). Eine deutliche Steigerung der Produktivität durch Mediumwechsel kann nur bei BKG- und

CV₁-Zellen festgestellt werden. Insgesamt erreichten die BKG-Zellen (mit und ohne Mediumwechsel) mit Abstand die höchste Zellproduktivität, gefolgt von den CV₁-Zellen (mit Mediumwechsel).

Tabelle 18: Zellproduktivität einiger Zellkulturen für Borna-Virus am 14. Tag p.inf.

<u>ZELLART</u>	<u>MEDIUM- WECHSEL</u>	<u>PLAQUES/ Kultur</u>	<u>Ø ZELLZAHL/ Plaque</u>	<u>IFT⁺-ZELLEN/ Kultur</u>	<u>INFEKTIOSITÄT Inf.E./Kultur</u>	<u>ZELLPRODUKTIVITÄT Inf.E./IFT⁺-Zelle</u>
CV ₁	-	2200	9,5	21.480	10 ^{3,322}	10 ^{-1,008}
	+	1580	37,0	61.300	10 ^{4,197}	10 ^{-0,585}
RK ₁₃	-	3850	3,4	13.100	10 ^{3,108}	10 ^{-1,008}
	+	2800	5,6	15.700	10 ^{2,518}	10 ^{-1,678}
Vero	-	3080	6,0	18.500	10 ^{2,000}	10 ^{-2,260}
	+	2200	9,0	19.800	10 ^{2,080}	10 ^{-2,229}
BKG	-	1790	5,2	9.310	10 ^{3,845}	10 ^{-0,125}
	+	2020	5,5	11.090	10 ^{4,492}	10 ^{0,448}
FHE	-	2000	22,0	44.000	10 ^{3,431}	10 ^{-1,208}
FLG	+	1860	4,3	8.030	10 ^{3,124}	10 ^{-0,782}
FLN	-	1860	6,8	12.600	10 ^{3,290}	10 ^{-0,810}

Erläuterung:

IFT⁺-Zelle = fluoreszenzpositive Zelle

Abb. 7: Vergleichende Darstellung der Produktivität einiger Zellarten für Borna-Virus am 14. Tag p.inf.

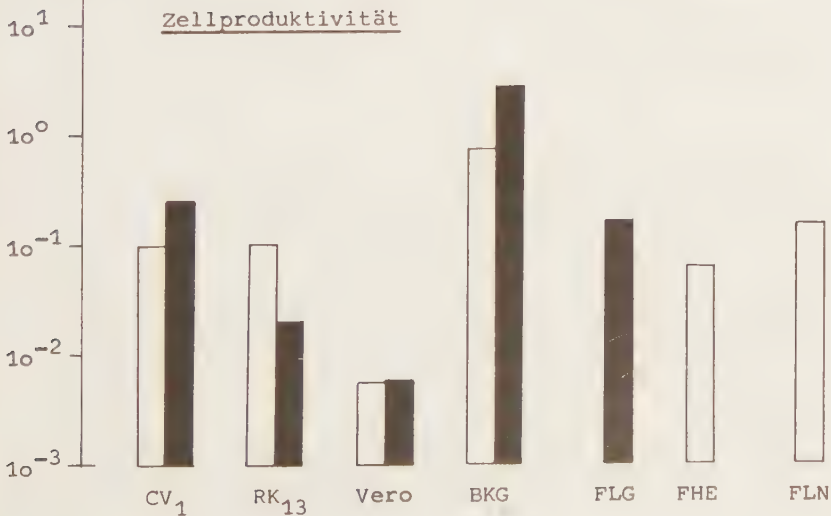
Ø Zellzahl/
fluoresz.Z.



■ mit
Mediumwechsel

□ ohne
Mediumwechsel

Inf.E./
IFT-Zelle



3.2.7 Verfahren zur Gewinnung von Borna-Virus aus permanent infizierten Zellkulturen

Im Hinblick auf eine Viruscharakterisierung war es nicht nur von Interesse, möglichst viel Virus in Zellkulturen zu produzieren, sondern die infizierten Zellen auch optimal auszubeuten. War zur Virusgewinnung in den vorangegangenen Versuchen stets eine im Labor übliche Standardmethode (1x Gefrier-Tauen plus 30 Sek. Ultraschall) eingesetzt worden, sollte nun mit speziellen Techniken versucht werden, ein Maximum an infektiösem Virus aus den Kulturzellen zu erhalten.

Vorversuche hatten gezeigt, daß infizierte Zellen kein Borna-Virus ins Kulturmedium freisetzen und die Infektiosität stark an die Zellfraktion gebunden ist. Sie sedimentiert beim Zentrifugieren weitgehend mit den Zellresten (ca. 50% bei der Virusgewinnung nach der Standardmethode). Während man für die weitere Virusproduktion mit rohen Präparationen arbeiten kann, müssen Virussuspensionen für physikalisch-chemische Untersuchungen hoch gereinigt sein. Ziel der Virusextraktion war daher, möglichst viel freies Virus zu gewinnen, das ohne große Verluste durch Zentrifugation gereinigt werden kann.

Zur Verfügung standen persistent mit Borna-Virus infizierte RK₁₃-Zellkulturen. Nachdem sie eine Zellrasendichte von 100% erreicht hatten, wurden sie verschiedenen Aufschluß- bzw. Extraktionsverfahren unterworfen. Alle durch die verschiedenen Methoden gewonnenen Zellextrakte wurden im folgenden zunächst ohne Behandlung auf ihre Gesamtinfektiosität geprüft. Nach einer reinigenden Zentrifugation von 15 Min. bei 2000 g kam dann in einem zweiten Arbeitsgang der Überstand zur Titration, um damit das freie Virus zu messen.

Alle Titrationen erfolgten in RK₁₃-Zellen in der üblichen Weise.

Da es nicht möglich war, alle Methoden gleichzeitig durchzuführen, diente in jedem Versuchsansatz das Ergebnis der bereits bewährten Standardmethode, mit und ohne Zentrifugieren, als Bezugspunkt für die vergleichende quantitative Auswertung.

Die Ergebnisse der Versuche faßt die Abbildung 8 zusammen.

3.2.7.1 Zellaufschluß durch Ultraschallbehandlung

Zellen wurden mit Erhaltungsmedium bei -70°C eingefroren, aufgetaut und in 2 ml-Portionen unbeschallt und nach jeweils 15, 60 und 240 Sek. Ultraschallbehandlung (im Eisbad) verwendet.

Ergebnis:

Mit zunehmender Beschallungsdauer nahm die Virusausbeute in der ungereinigten Zellfraktion zu, und auch die Verluste durch Zentrifugation gingen von 90% bei der unbeschallten Fraktion auf 20% (nach 4 Min. Ultraschall) zurück. Nach 4 Min. Ultraschallbehandlung wurde die Infektiosität der Standardpräparation um 25% vor und 100% nach dem Zentrifugieren übertroffen.

3.2.7.2 Zellaufschluß durch Gefrier-Tauen

Zellen wurden mit Erhaltungsmedium einer unterschiedlichen Anzahl von Gefrier-Tau-Zyklen (1x, 2x und 4x) ausgesetzt und anschließend als grobe Suspension sowie nach Zentrifugation titriert.

Ergebnis:

Die Virusausbeute stieg mit der Anzahl der Gefrier-Tau-Zyklen insgesamt geringfügig an, allerdings wurden die Werte der Standardmethode in keinem Fall erreicht. Der Infektiositätsverlust nach Zentrifugation betrug stets 80-90%.

3.2.7.3 Zellaufschluß in verschiedenen Medien

Zellen wurden parallel mit

- frisch zugesetztem Erhaltungsmedium,
- Earle'scher Lösung und
- SPGA-Puffer zur Virusstabilisation
(CALNEK und Mitarb., 1972)

nach der Standardmethode aufgeschlossen.

Ergebnis:

Keines dieser Medien brachte irgendwelche Vorteile gegenüber dem üblicherweise benutzten Verfahren, die Zellen im eigenen (alten) Erhaltungsmedium aufzuschließen. Nach dem Zentrifugieren war der Virusgehalt durchwegs um die Hälfte gesunken.

3.2.7.4 Zellaufschluß durch Aqua dest.-Behandlung

Kulturen wurden mit STV-Lösung von der Glaswand abgelöst, durch leichtes Zentrifugieren (5 Min. bei 500 g) gewonnen und davon jeweils ca. 3 Mio. Zellen in 5 ml destilliertem Wasser resuspendiert. Die Suspensionen wurden 10 Min. bei Zimmertemperatur belassen, anschließend mit 0,5 ml einer zehnfach konzentrierten Salzlösung und 1,5 ml Medium auf 7 ml aufgefüllt und vor und nach scharfem Zentrifugieren verimpft (COOK und SEARS, 1970).

Um die Infektiosität im noch verbliebenen Endsediment zu

bestimmen, wurde es erneut in Erhaltungsmedium suspendiert, 30 Sek. ultrabeschallt (im Eisbad) und titriert.

Ergebnis:

Durch Wasserlysis konnte die Virusausschüttung der unzentrifugierten Suspension gegenüber der Standardmethode um 20% erhöht werden, allerdings gingen davon durch Zentrifugieren ca. 90% verloren. Dagegen erbrachte die Kombination mit Ultraschall Werte, die diejenigen der Standardmethode um 70% (ohne Zentrifugation) bzw. 40% (nach Zentrifugation) übertrafen.

3.2.7.5 Zellaufschluß durch Saline-Behandlung

Das Verfahren entsprach im wesentlichen dem der Aqua dest.-Behandlung; die Inkubation erfolgte hierbei mit 1,0 ml einer zehnfach konzentrierten Saline-Lösung pro 3 Mio. Zellen. Vor der Verimpfung wurden die Zellsuspensionen mit je 6,0 ml Medium aufgefüllt.

Ergebnis:

Auch hier ergab sich eine signifikante Erhöhung der Virusausbeute erst bei Kombination mit Ultraschall; sie betrug jedoch nur 50% vor und 10% nach Zentrifugation gegenüber der Standardmethode.

3.2.7.6 Virusextraktion mit Glycin-Puffer

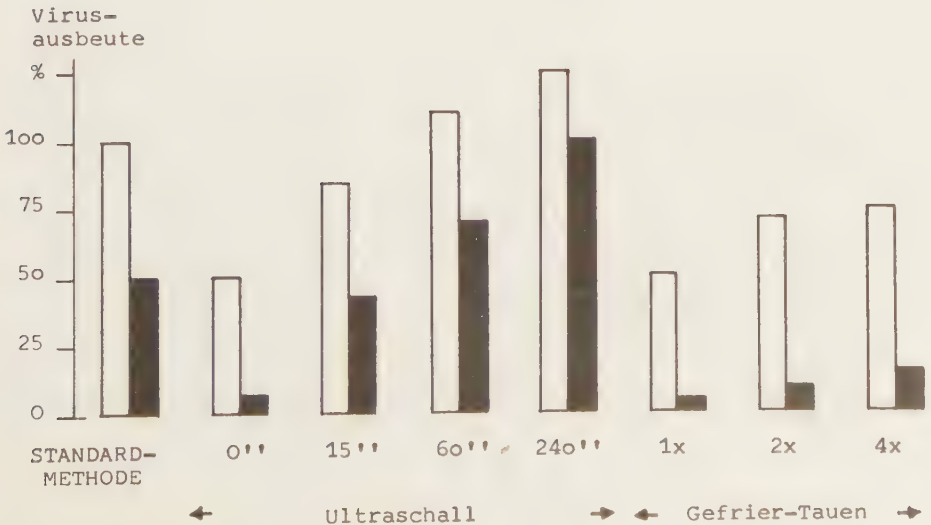
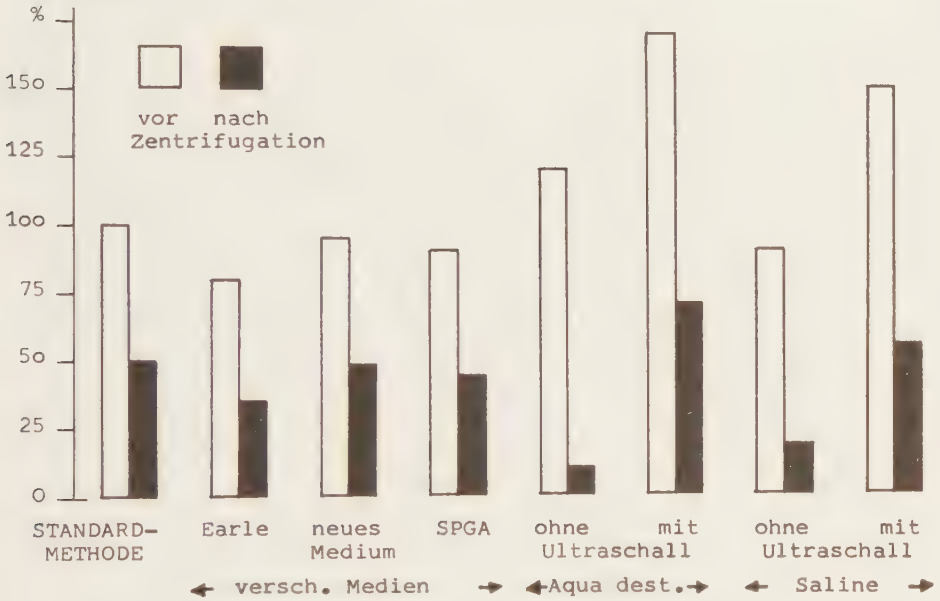
Zellkulturen (jeweils ca. 3 Mio. Zellen) wurden nach gründlicher Spülung parallel mit je 1,5 ml 0,1M und 0,2M Glycinpuffer 30 Min. bei Zimmertemperatur inkubiert (HALLAUER und KRONAUER, 1965; PROBSTMEYER und Mitarb., 1967). Die Untersuchungen der Pufferlösungen auf Virusgehalt erfolgten nach Ergänzung mit jeweils 5,5 ml Erhaltungsmedium.

Dieses Verfahren wurde mit den selben Kulturen zweimal wiederholt.

Ergebnis:

In keiner der untersuchten Puffer-Fraktionen konnte infektiöses Virus nachgewiesen werden. Die anschließend nach der Standardmethode aufgeschlossenen Zellen erbrachten eine Virusausbeute, die der nicht vorbehandelter Zellkulturen entsprach.

Abb. 8: Vergleichende Darstellung der Borna-Virus-Ausbeute mit verschiedenen Gewinnungsmethoden



4.

BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Persistente Virusinfektionen sind wie in vivo auch in vitro sehr schwer zu erfassen. Problematisch sind dabei meist der Virusnachweis in der Zelle und die Gewinnung größerer Virusmengen, da die Virussynthese nur spärlich, sehr langsam und oft unvollständig abläuft. Die Viruscharakterisierung ist dadurch sehr erschwert. In der Literatur nehmen entsprechende Berichte einen breiten Raum ein. Infektionen mit Tollwut- (WIKTOR und KOPROWSKI, 1966), Masern- (RUSTIGIAN, 1966), LCM- (LEHMANN-GRUBE, 1971), Cytomegalie- und Epstein-Barr-Virus (JACK, 1974) sind nur einige Beispiele für persistierende Virus-Zell-Systeme, über die intensive Laboruntersuchungen angestellt worden sind. Das Hauptinteresse richtete sich dabei auf die Ausarbeitung einer optimalen Nachweisteknik, ebenso sehr aber auf die Möglichkeit, die persistente Infektion zu aktivieren, um maximale Virusmengen zu produzieren. Hierzu gehören auch Verfahren zum schonenden Aufschluß der infizierten Zellen und zur Stabilisierung des gewonnenen Virus.

Borna-Virus führt in Zellkulturen zu persistenten Infektionen (MAYR und DANNER, 1974), in deren Verlauf es nicht zur Veränderung oder Zerstörung der infizierten Zellen kommt. Sporadisch auftretende Kern-Einschlußkörperchen sind nur bedingt zum Virusnachweis geeignet. Dagegen hat sich die Immunofluoreszenz sowohl für den qualitativen als auch quantitativen Virusnachweis bewährt (DANNER und MAYR, 1973; MAYR und DANNER, 1974; LUDWIG und Mitarb., 1973). Diese Methode stellte auch die technische Grundlage für die vorliegenden Untersuchungen dar, die sich mit dem Verhalten von Borna-Virus in verschiedenen Zellkulturen befaßten.

Erkrankungen durch das Borna-Virus kommen in der Natur nur bei Pferd und Schaf vor, während das Spektrum der im Experiment sensiblen Versuchstiere sehr weit ist (HEINIG, 1969). Insofern war die Erfahrung interessant, daß auch in vitro nahezu alle getesteten Zellsysteme für das Virus empfänglich waren. Das gilt nicht nur für Zellen verschiedener Species, sondern auch für unterschiedliche Zelltypen. Dies ist wesentlich, da der Borna-Erreger bisher als streng neurotrop galt und sich durch Einschlußkörperchenbildung auch nur in Neuronen manifestiert. Nach den heutigen Erkenntnissen ist es aber wahrscheinlich, daß sich Borna-Virus auch in vivo in nicht-neuralen Zellen vermehren und den Organismus so auf direkte oder indirekte Weise schädigen kann. Diese Tatsache hat sowohl für Pathogenese und Pathologie als auch für die Epidemiologie der Bornaschen Erkrankung Konsequenzen. Für die Aufklärung der Immunogenese ist evtl. von Bedeutung, daß es nicht gelungen ist, Borna-Virus in immunkompetenten Zellen wie Makrophagen und Lymphozyten zu züchten.

Nicht alle für Borna-Virus empfänglichen Zellarten eignen sich für den Nachweis des Erregers, da zum einen große Unterschiede in ihrer quantitativen Empfindlichkeit bestehen, andererseits aber auch solche Kriterien wie Haltbarkeit der Kulturen, Brillanz der Fluoreszenz und Deutlichkeit der fluoreszierenden Zell-Foci bei einigen Zellarten nicht optimal ausgeprägt sind. Generell sind Primärzellen teilweise ebenso empfindlich wie Zell-Linien; von Ansatz zu Ansatz schwanken die Ergebnisse bei ersteren jedoch derartig, daß für Routineuntersuchungen hauptsächlich Zell-Linien herangezogen werden sollten. Zell-Linien sind im Labor auch leichter zu manipulieren und dadurch von entscheidendem Vorteil gegenüber Primärkulturen. Am empfindlichsten erwiesen sich die RK₁₃- und CV₁-Zellen, die dann auch routinemäßig für fluoreszenzserologische Virustitrierungen eingesetzt wurden.

Damit wird eine der größten Schwierigkeiten bei der Arbeit mit dem Borna-Virus in vielfacher Hinsicht erleichtert: Abgesehen vom tierschützerischen Aspekt - der Nachweis des Borna-Virus wurde früher ausschließlich durch den Kaninchen-Versuch geführt - steht nun ein labortechnisch einfaches System zur Verfügung, das hoch spezifisch und zudem rasch auszuwerten ist. Während die Infektion im Kaninchen nach intracerebraler Infizierung erst nach 3-4 Wochen oder sogar mehreren Monaten klinisch manifest wird und erst noch durch weitere Untersuchungen spezifiziert werden muß, bekommt man das spezifische Ergebnis in der Zellkultur bereits nach ca. 5 Tagen.

Die Frage, ob das Zell-Verfahren absolut, im Vergleich zum Tierversuch, genügend empfindlich ist, wurde durch vergleichende Titration für BKG- und CV₁-Zellen beantwortet: Zellkulturen erwiesen sich als nur 5- bis 10-fach weniger empfindlich gegenüber Kaninchen; dieser leichte Nachteil wird aber durch die anderen Vorteile aufgewogen.

Die Virustitration ließ sich in zusätzlichen Untersuchungen standardisieren. Wenn auch erste Borna-infizierte Kulturzellen bereits zwei Tage p.inf. beginnende Kernfluoreszenz aufwiesen, sind doch erst am 5. Tag alle primär infizierten Zellen fluoreszenzpositiv. Danach breitet sich das Virus durch Zell-zu-Zell-Infektion lokal aus - es entstehen fluoreszierende "Mikroplaques" (DANNER und BACHMANN, 1970), eine Virusaussaat über das Medium mit Bildung sekundärer Plaques besteht nicht. Diese streng lokale Virusausbreitung ermöglicht Virustitrationen ohne die Arbeit mit halbfesten "Overlays" wie Agar oder Tylose, die bei anderen Virusarten die Sekundärausbreitung verhindern müssen (SCHWÖBEL, 1961).

Am 5. Tag p.inf. sind die fluoreszierenden Foci optisch bereits gut erfaßbar; andererseits überlappen sie sich auch bei größeren Inokula noch nicht und können gut ausgezählt werden. Durch Alterung der Kulturen (nach dem 10. Tag p.inf.) kann es zur Ablösung infizierter Zellen und entweder einem verfälscht kleinen Titrationsergebnis kommen oder, besonders bei RK₁₃-Zellen, zur Bildung von Sekundärplaques.

Eine exakte Titration wird man aus diesen Gründen bei den getesteten CV₁- und RK₁₃-Zellen zwischen dem 5. und 10. Tag p.inf. durchführen müssen.

Aus Untersuchungen über den optimalen Zellstatus (Alter) und die günstigste Infizierungstechnik kann geschlossen werden, daß sich am besten für die Virustitration (in RK₁₃-Zellen) Kulturen eignen, wenn sie 4 Tage nach dem Ansatz infiziert werden - sie zeigen dann am 5. Tag p.inf. in gleichmäßiger Verteilung deutliche fluoreszierende Foci mit 1-4 Zellen. Neben der Inokulationsmethode erscheint die Infizierung mit 4-stündiger Adsorption bei 37°C am geeignetsten.

Zellkulturen sollten nicht nur zu Nachweis und Titration des Borna-Virus eingesetzt werden, sondern auch zur Virusproduktion. Unter diesem Aspekt wurden einige der Zellkulturen untersucht, die sich als besonders empfindlich für das Virus gezeigt hatten. Der Ablauf von Virusausbreitung und Virusvermehrung wurde in der CV₁-Zell-Linie und in Kulturen aus Gehirnzellen foetaler Lämmer (FLG) und infantiler Kaninchen (BKG) beobachtet. Eine Einschnitt-Vermehrungskurve wie z.B. bei Schweinepest-Virus (DANNER und BACHMANN, 1970) ließ sich wegen quantitativer Bedingungen nicht erzielen, der Infektionsablauf deckte sich jedoch in den verschiedenen Zellkulturen.

Vor dem 4. Tag p.inf. konnte in keinem System neugebildetes Virus nachgewiesen werden. Die Vermehrung nahm dann bei regelmäßigem Mediumwechsel stetig bis zum Ende der Kultivierung zu

(3-4 Wochen). Wurde das Medium der Zellkulturen nicht regelmäßig wöchentlich erneuert, sank der Gehalt an neusynthetisiertem, infektiösem Virus bereits nach 1 bis 2 Wochen, um dann zum Teil bis unter die Nachweisgrenze abzufallen. Infektiöses Virus fand sich bei allen Experimenten stets nur in der Zellfraktion, nie im Kulturmedium.

Die lokale Virusausbreitung, d.h. das Wachstum der fluoreszierenden Mikroplaques, verlief in der Regel parallel zur Virusvermehrung.

Aus den gewonnenen Ergebnissen lassen sich genauere Parameter der Virusvermehrung nicht ableiten, vor allem nicht die Dauer des Virusvermehrungszyklus in der Zelle. Gemessen am Auftreten der Fluoreszenz in "Nachbarzellen" kann er aber mit ca. 2-3 Tagen angegeben werden. Insgesamt wird sehr deutlich, daß sich Borna-Virus außerordentlich langsam vermehrt. Dies ist sicherlich mit ein Grund für die langen Inkubationszeiten im infizierten Tier. Hierzu kommt die verzögerte Ausbreitung wegen fehlender Virusfreisetzung.

Auch bezüglich Virusproduktion erwiesen sich die verschiedenen geprüften Zellarten als unterschiedlich geeignet. Dies liegt zum Teil an der ungleichmäßigen Empfindlichkeit der Zellen. Um ein einheitliches Maß aufzustellen, mußte die Virusproduktion deswegen auf die infizierte (fluoreszenzpositive) Einzelzelle bezogen werden (Begriff der "Zellproduktivität"). Aus der Produktivität der infizierten Einzelzelle und der Ausbreitungsfreudigkeit des Virus in der Kultur ergibt sich somit die unterschiedliche Produktivität in der Gesamtkultur, wenn man die gleiche Anzahl primär infizierter Zellen zugrunde legt. In praxi kommt hierzu bei gleichem Inokulum noch der Faktor der variablen Empfindlichkeit.

Es war interessant festzustellen, daß die Produktivität einzelner infizierter Zellen äußerst gering ist. Sie reicht von $10^{-2,260}$ Inf.E. bei Vero-Zellen bis zu $10^{0,448}$ Inf.E. bei BKG-Zellen. Von den untersuchten Zellkulturen scheinen sich BKG-Zellen insgesamt am besten für eine maximale Virusvermehrung zu eignen:

Sie sind hoch empfindlich, die Virusausbreitung geht relativ rasch vor sich, und die Virusaussbeute pro Zelle ist besser als bei den anderen Zellarten.

Von den Zell-Linien, die labortechnisch einfacher zu handhaben sind, haben CV₁-Zellen die produktivste Virusvermehrung, liegen aber in der Zellproduktivität ca. 10-fach unter den BKG-Zellen. Bei allen Kulturen ist es wichtig, das Medium öfters zu wechseln, um die Zellen in der Virusproduktion zu unterstützen.

Insgesamt war die Virusaussbeute bei den infizierten Zellkulturen nicht befriedigend. Bei lytischen Virus-Zell-Systemen geht der Ertrag pro Zelle bis zu 10^3 infektiösen Viruseinheiten! Die geringe Produktivität bei Borna-Virus kann durch mehrere Gründe bedingt sein:

Virus wird von der Zelle nur in geringer Quantität gebildet; es werden defekte Viruspartikel synthetisiert; in der Zellkultur werden virushemmende Stoffe produziert; Viruseinheiten lassen sich nur schwer aus der Zelle extrahieren oder sind in Suspension sehr instabil.

In Versuchen zur Abklärung der beiden letztgenannten Fragen ergab sich eindeutig, daß Borna-Virus überaus stark an die Zelle bzw. einzelne Zellstrukturen gebunden ist. Die größte Infektiosität wiesen stets Präparationen auf, die Zellen oder Zellteile enthielten. Wurden sie durch Zentrifugation geklärt, blieb der Großteil der Infektiosität im Zentrifugat und nicht im Überstand. Je gründlicher die gewonnenen,

Borna-infizierten Zellen zerstört werden, desto mehr steigt auch die Infektiosität der Präparationen. Ultraschallbehandlung über mehrere Minuten (gut gekühlt!), evtl. mit vorheriger Zerstörung der Zellen durch osmotischen Schock (destilliertes Wasser bzw. konzentrierte Salzlösung) liefert hinsichtlich maximaler Ausbeute die besten Resultate. Wenn hier- nach auch die Infektiosität des Überstandes nach Zentrifugation ansteigt, liegt dies möglicherweise daran, daß die Zellen in derart kleine Partikel aufgeteilt werden, die dann bei der üblichen Zentrifugation im Überstand verbleiben.

HALLAUER und KRONAUER (1965) haben zur maximalen Virusex- traktion aus Zellkulturen die Behandlung mit alkalischem Glycin- oder Borat-Puffer empfohlen. Die Anwendung dieser Methode auf Borna-infizierte Zellkulturen brachte keinen Er- folg. Andererseits hatten CALNEK und Mitarb. (1972) zur schonenden und stabilisierenden Extraktion von Puten-Herpes- virus die Verwendung eines speziellen Puffers (SPGA-Puffer) vorgeschlagen. In den eigenen Versuchen hatte die Art und Zusammensetzung des zur Virusgewinnung verwendeten Mediums keine signifikante Auswirkung auf die Höhe der Virusausbeute.

Alle Anzeichen sprechen dafür, daß Borna-Virus sehr stark an die vermehrende Zelle gebunden ist. Weitere Untersuchun- gen müssen zeigen, über welche Zellstrukturen die Virussyn- these abläuft und wie die Vermehrung so aktiviert werden kann, daß Virus in größerer Quantität produziert oder sogar von der Zelle freigesetzt wird. Einen grundlegenden Beitrag für entsprechende weitere Versuche haben die vorgelegten Ergebnisse geleistet.

5.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Als Grundlage für weitere Untersuchungen über das Borna-Virus und die Borna-Infektion wurde das Verhalten des Virus in verschiedenen Zellkulturen untersucht. Ziel der Arbeit war die Erarbeitung eines Systems für den optimalen Nachweis und die maximale Produktion von Borna-Virus.

Für Borna-Virus erwies sich eine Vielzahl von primären und permanent geführten Zellkulturen verschiedener Herkunft als empfänglich. Am sensibelsten waren RK₁₃-Zellen, die für Routinetitrationen verwendet wurden. Titrationen können durch Auszählen fluoreszierender Foci ab dem 5. Tag p.inf. durchgeführt werden. Da infektiöses Virus von den infizierten Zellen nicht freigesetzt wird, braucht eine Sekundäraussaat nicht befürchtet und ein visköser Mediumzusatz nicht verwendet zu werden.

Borna-Virus vermehrt sich in Zellkulturen sehr langsam. Infektiosität tritt in den Kulturen erst nach dem 4. Tag p.inf. auf und nimmt über Wochen stetig zu. Die Virussyntese scheint dabei vom Ernährungszustand der Zellen abzuhängen. Die Virusaussbeute, bezogen auf die infizierte Einzelzelle, ist außerordentlich gering. Die Herstellung großer Virusmengen ist dadurch erschwert. Relativ gut eignen sich primäre Zellkulturen aus Gehirnen infantiler Kaninchen und die CV₁-Zell-Linie.

Borna-Virus scheint stark an die vermehrende Zelle assoziiert zu sein. Die Gewinnung infektiöser Präparationen läßt sich nur über eine sorgfältige Zellzerstörung erreichen, wobei Ultraschallbehandlung besonders effektiv ist.

Die Ergebnisse sind nicht nur für die Laborarbeit mit dem Borna-Virus von Bedeutung, sondern tragen eventuell mit dazu bei, die Charakteristika der Borna-Infektion in vivo zu verstehen.

S U M M A R Y

Qualitative and quantitative studies on the
cultivation of Bornavirus in cell cultures

The behaviour of Bornavirus in different cell culture systems was studied in order to establish a technical basis for further investigations on Bornavirus and Bornavirus infection. Aim of the dissertation was the evaluation of optimal methods for demonstration, titration and production of Bornavirus.

A wide spectrum of various primary or permanent cell cultures originating from different species showed its sensitivity for Bornavirus. Most suited was the RK₁₃ cell line, that has been used for routine titrations. Titrations easily can be performed by counting the fluorescent foci after the 5th day post inoculation. Infectious virus never is eluted by the cells, thus secondary virus spread does not occur. The use of a solid overlay is not necessary.

Bornavirus replicates very slowly in the culture cells. Infectivity cannot be demonstrated until the 4th day post inoculation. The virus amount increases over a period of several weeks, if culture medium is regularly renewed and the cells are in a good nutritional condition. The harvest of virus, however, is extremely poor as related to the singular infected cell. Thus the virus production on a large scale is very difficult. Relatively well suited are primary cell cultures of infantile rabbits' brains or the CV₁ cell line.

Accordingly to the presented results Borna virus seems to be strongly cell-associated. For the preparation of highly infectious virus suspensions a thorough destruction of the culture cells is necessary, e.g. by ultrasonic disruption.

These results are of some significance regarding practical work with the Borna virus. They furthermore may help to understand better the complex characteristics of Borna virus infections in the animal.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. AAY, C., and P. BORST, 1975: The gel electrophoresis of DNA. Biochemica et Biophysica Acta 269, 192.
2. ABELSON, H.T., G.H. SMITH, H.A. HOFFMANN and W.P. ROWE, 1969: Use of enzyme-labeled antibody for electron microscope localization of lymphocytic choriomeningitis virus antigens in infected cell cultures. J. nat. Cancer Inst. 42, 497.
3. ACKERMANN, R., 1961: Die Züchtung des Virus der Lymphozytären Choriomeningitis in der Gewebekultur. Habilitationsschrift, Köln.
4. AYNAUD, J.M., 1968: Étude de la multiplication in vitro d'un clone du virus de la peste porcine. Rech. veter. 1, 25.
5. BALL, F.R., and E.L. MEDZON, 1973: Sedimentation changes of L cells in a density gradient early after infection with vaccinia virus. J. Virol. 12, 588.
6. BARLOW, J.L., and T. MUSTICO, 1966: Noninfectious antigens associated with lymphocytic choriomeningitis infection. A. R. for 1965, Div. Lab. Res., N.Y. St. Dep. Hlth. (Albany), 60.
7. BARLOW, J.L., S.M. COHEN, I. TRIANDAPHILLI and E. KELLER, 1965: Identification of the nucleic acid of lymphocytic choriomeningitis virus. N.Y. State Dep. Health, Ann. Rep. Div. Lab. Res., 59.
8. BEASLEY, A.R., W. LICHTER and M.M. SIGEL, 1960: Studies on latent infections of tissue cultures with Dengue virus. I. Characteristics of the system. Arch. ges. Virusforsch. 10, 672.

9. BELL, T.M., and M.G.R. ROSS, 1966: Persistent latent infection of human embryonic cells with reovirus type 3. *Nature*, Lond. 212, 412.
10. BENDA, R., V. HRONOVSKY, L. ČĚRVA and J. ČINÁTL, 1965: Demonstration of lymphocytic choriomeningitis virus in cell cultures and mouse brain by the fluorescent antibody technique. *Acta Virol.* 9, 347.
11. BENNETT, B., 1966: Isolation and cultivation in vitro of macrophages from various sources in the mouse. *Amer. J. Path.*, 48, 165.
12. BENSON, L., and J. HOTCHIN, 1969: Antibody formation in persistent tolerant infection with lymphocytic choriomeningitis virus. *Nature*, Lond. 222, 1045.
13. BEUTNER, E.H., 1961: Immunofluorescent staining: The fluorescent antibody method. *Bact. Rev.* 25, 49.
14. BOXACA, M., V. SAVY y O.A. GIOVANNIELLO, 1972: Células Vero persistentemente infectadas con virus Junín. I. Comportamiento de la línea Vero IR 58 frente a la sobreinfección con dos cepas del virus Junín. *Medicina, B.Aires* 32, 269.
15. BREESE, S.S.JR., and C.J. DeBOER, 1966: Electron microscope observations of African swine fever virus in tissue culture cells. *Virology* 28, 420.
16. BREESE, S.S.JR., and W.R. HESS, 1966: Electron microscopy of African swine fever virus hemadsorption. *J. Bact.* 92, 272.
17. BREESE, S.S.JR., S.S. STONE, C.J. DeBOER and W.R. HESS, 1967: Electron microscopy of the interaction of African swine fever virus with ferritin-conjugated antibody. *Virology* 31, 508.
18. BROWN, W.J., and B.E. KIRK, 1969: Complement-fixing antigen from BHK-21 cell cultures infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *Appl. Microbiol.* 18, 496.

19. BROWN, G.C., H.F. MAASSAB, J.A. VERONELLI and T. FRANCIS JR., 1965: Detection of rubella antibodies in human serum by the indirect fluorescent antibody technique. Arch. ges. Virusforsch. 16, 459.
20. BUNGE, R.P., and D.H. HARTE, 1969: Cytopathic effects of visna virus in cultured mammalian nervous tissue. J. Neuropath. exp. Neurol. 28, 185.
21. CALNEK, B.W., C. GARRIDO, W. OKAZAKI and I.V. PATRASCU, 1972: In vitro methods for assay of turkey herpesvirus. Avian Dis. 16, 52.
22. CARBREY, E.A., W.C. STEWART, J.L. KRESSE and L.R. LEE, 1965: Technical aspects of tissue culture fluorescent antibody technique. Proc. Ann. Meet. U.S. Livestock Sanit. Ass. 69, 487.
23. CARNERO, R., B. LARENAUDIE, F. GONSALVO RUIZ et J. HAAG, 1967: Peste porcine Africaine. Etudes sur la réaction d'hémadsorption et son inhibition par des anticorps spécifiques. Rec. Méd. vét. 143, 49.
24. CASALS, J., and S.M. BUCKLEY, 1974: Lassa fever. Progr. med. Virol. 18, 111.
25. CHANDLER, R.L., 1961: Encephalopathy in mice produced with scrapie brain material. Lancet I, 1378.
26. CHEN, J.H., and H.G. PURCHASE, 1970: surface antigen on chick kidney cells infected with the herpesvirus of Marek's disease. Virology 40, 410.
27. CHUBB, R.C., and A.E. CHURCHILL, 1968: Precipitating antibodies associated with Marek's disease. Vet. Rec. 83, 4.
28. CHURCHILL, A.E., and P.A. BIGGS, 1967: Agent of Marek's disease in tissue culture. Nature, Lond. 215, 528.
29. CHURCHILL, A.E., and P.A. BIGGS, 1968: Herpes-type virus isolated in cell culture from tumors of chickens with Marek's disease. II. Studies in vivo. J. nat. Cancer Inst. 41, 951.

30. CLARKE, M.C., and D.A. HAIG, 1970: Multiplication of scrapie agent in cell culture. Res. vet. Sci. 11, 500.
31. COGGINS, L., 1966: Growth and certain stability characteristics of African swine fever virus. Amer. J. vet. Res. 27, 1351.
32. COGGINS, L., 1968: A modified hemadsorption-inhibition test for African swine fever virus. Bull. epizoot. Dis. Afr. 16, 61.
33. COGGINS, L., 1974: African swine fever virus. Progr. med. Virol. 18, 48.
34. COOK, M.K., and J.F. SEARS, 1970: Preparation of infectious cell-free herpes-type virus associated with Marek's disease. J. Virol. 5, 258.
35. COONS, A.H., and M.H. KAPLAN, 1950: Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. J. exp. Med. 91, 1.
36. COTO, C.E., and M.D. DE VOMBERGAR, 1969: The effect of 5-iododeoxyuridine and actinomycin D on the multiplication of Junín virus. Arch. ges. Virusforsch. 27, 307.
37. CRAWFORD, T.B., T.C. MCGUIRE and J.B. HENSON, 1971: Detection of equine infectious anemia virus in vitro by immunofluorescence. Arch. ges. Virusforsch. 34, 332.
38. DANNER, K., 1975: Neues über das Borna-Virus. Vortrag beim XI. Kongreß d. Dtsch. Veterinärmed. Gesellschaft in Bad Nauheim, 10. - 12. April 1975.
39. DANNER, K., und P.A. BACHMANN, 1970: Vermehrung und Ausbreitung von Schweinepestvirus, Stamm München 1, in PK 15 Zellkulturen. Zbl. Vet. Med. B, 17, 353.

40. DANNER, K., und A. MAYR, 1973: Fluoreszenzserologische Untersuchungen über das Auftreten von Borna-Virus - antigen in Zellkulturen aus Gehirnexplantaten infizierter Kaninchen. Zbl. Vet. Med. B, 20, 497.
41. DANNER, K., und A. MAYR, 1975: Borna agent - a slow virus. Vortrag beim 3. Intern. Kongreß für Virologie, Madrid, 10. - 17. Sept. 1975.
42. DARBYSHIRE, J.H., 1962: Agargel diffusion studies with a mucosal disease of cattle. II. A serological relationship between a mucosal disease of cattle and swine fever. Res. Vet. Sci. 3, 125.
43. DARBYSHIRE, J.H., 1965: The diagnosis of swine fever by immunodiffusion. FAO-OIE Meet. on Hog Cholera and African Swine Fever, Rome.
44. DOI, Y., T. SANPE, M. NAKAJIMA, S. OKAWA, T. KATOH, H. ITOH, T. SATO, K. OHUCHI, T. KUMANISHI and T. TSUBAKI, 1972: Properties of a cytopathic agent isolated from a patient with subacute sclerosing panencephalitis in Japan. Jap. J. Med. Sci. Biol. 25, 321.
45. DUBOIS-DALCQ, M., and L. HORTA-BARBOSA, 1973: Immunoperoxidase stain of measles antigen in tissue culture. J. Virol. 12, 909.
46. DUBOIS-DALCQ, M., L. HORTA-BARBOSA, R. HAMILTON and J.L. SEVER, 1974: Comparison between productive and latent subacute sclerosing panencephalitis viral infection in vitro. Lab. Invest. 30, 241.
47. DUESBERG, P.H., and P.K. VOGT, 1973: Gel electrophoresis of avian leukosis and sarcomaviral RNA in formamide: Comparison with other viral and cellular RNA species. J. Virol. 12, 594.
48. DULBECCO, R., and M. VOGT, 1952: Monolayer tissue cultures. Proc. Nat. Acad. Sci. 38, 376.

49. EHRNST, A., L. WEINER and E. NORRBY, 1974: Fluctuations and distribution of measles virus antigens in chronically infected cells. *Nature* 248, 691.
50. ENDERS, J.F., and T.C. PEEBLES, 1954: Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proc. Soc. exp. Biol., N.Y.* 86, 277.
51. EPSTEIN, M.A., B.G. ACHONG and Y.M. BARR, 1964: Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* I, 702.
52. EPSTEIN, M.A., B.G. ACHONG, A.E. CHURCHILL and P.M. BIGGS, 1968: Structure and development of the herpes-type virus of Marek's disease. *J. nat. Cancer Inst.* 41, 805.
53. EVANS, R., and M.H. SALAMAN, 1965: Studies on the mechanism of action of Riley virus. III. Replication of Riley's plasma enzyme-elevating virus in vitro. *J. exp. Med.* 122, 993.
54. FENNER, F.J., and D.O. WHITE, 1971: Medical virology. Academic Press N.Y. and London.
55. FERNANDES, M.V., T.J. WIKTOR and H. KOPROWSKI, 1964: Endosymbiotic relationship between animal viruses and host cells. *J. exp. Med.* 120, 1099.
56. FIELD, E.J., and G.D. WINDSOR, 1965: Cultural characters of scrapie mouse brain. *Res. Vet. Sci.* 6, 130.
57. FRANTSI, C., and K.F. GREGORY, 1968: Reproduction of the lactate dehydrogenase-elevating (Riley) virus in mouse embryonic liver cell cultures. *Virology* 37, 145.
58. GARFINKLE, B., and B.R. MCAUSLAN, 1973: Non-cytopathic, non-productive infection by herpes simplex viruses types 1 and 2. *Intervirology* 1, 362.

59. GERBER, P., 1972: Activation of Epstein-Barr virus by 5-bromodeoxyuridine in 'virus-free' human cells. Proc. nat. Acad. Sci., Wash. 69, 83.
60. GLASER, R., and F. RAPP, 1972: Rescue of Epstein-Barr virus from somatic cell hybrids of Burkitt lympho-blastoid cells. J. Virol. 10, 288.
61. GUSTAFSON, D.P., and C.L. KANITZ, 1964: Long-term cell cultures from the brain of a sheep affected with scrapie. Report of Scrapie Seminar, Wash., D.C., 69.
62. GUSTAFSON, D.P., and C.L. KANITZ, 1965: Evidence of the presence of scrapie in cell cultures of brain. In "Slow, Latent and Temperate Virus Infections", NINB monogr. 2, 221.
63. HAAG, J., and B. LARENAUDIE, 1965: Peste porcine Africaine. L'effet cytopathogène du virus en culture leucocytaire. Bull. Off. int. Epizoot. 63, 191.
64. HAIG, D.A., and I.H. PATTISON, 1967: In vitro growth of pieces of brain from scrapie-affected mice. J. Path. Bact. 93, 724.
65. HALLAUER, C., 1930: Die Viruszüchtung im Gewebsexplantat. In: Handbuch der Virusforschung, Bd. 1, 369, Springer Verlag, Wien.
66. HALLAUER, C., and G. KRONAUER, 1965: Extraction of cell-associated virus without damage of the culture. Arch. ges. Virusforsch. 15, 433.
67. HAMPAR, B., J.D. DERGE, M.L. MARTOS and J.L. WALKER, 1972: Synthesis of Epstein-Barr virus after activation of the viral genome in a "virus-negative" human lympho-blastoid cell (Raji) made resistant to 5-bromodeoxy-uridine. Proc. nat. Acad. Sci., Wash. 69, 78.

68. HAMPAR, B., J.G. DERGE, L.M. MARTOS, M.A. TAGAMETS, S. CHANG and M. CHAKRABARTY, 1973: Identification of a critical period during the s phase for activation of the Epstein-Barr virus by 5-iododeoxyuridine. *Nature New Biol.* 244, 214.
69. HANSHAW, J.B., 1968: Cytomegaloviruses. *Virol. Monogr.* 3, Springer Verlag, New York.
70. HARTER, D.H., and P.W. CHOPPIN, 1967a: Plaque assay of visna virus using a secondary cellular overlay as an indicator. *Virology* 31, 176.
71. HARTER, D.H., and P.W. CHOPPIN, 1967b: Cell-fusing activity of visna virus particles. *Virology* 31, 279.
72. HARTER, D.H., K.C. HSU and H.M. ROSE, 1967: Immunofluorescence and cytochemical studies of visna virus in cell culture. *J. Virol.* 1, 1265.
73. HAUSEN, H. ZUR, and H. SCHULTE-HOLTHAUSEN, 1970: Presence of EB virus nucleic acid homology in a 'virus-free' line of Burkitt tumor cells. *Nature, Lond.* 227, 245.
74. HEINIG, A., 1969: Die Bornasche Krankheit der Pferde und Schafe. In: "Handbuch der Virusinfektionen bei Tieren", Bd. 4, 83, Fischer Verlag, Jena.
75. HENLE, G., and W. HENLE, 1966: Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. *J. Bact.* 91, 1248.
76. HENLE, G., F. REINHARDT and A. GIRARDI, 1954: Cytolytic effects of mumps virus in tissue cultures of epithelial cells. *Proc. Soc. exp. Biol., N.Y.* 87, 386.
77. HENSON, J.B., T.C. MCGUIRE, K. KOBAYASHI, K.L. BANKS, W.C. DAVIS and J.R. GORHAM, 1970: Recent research on the virology, serology and pathology of equine infectious anemia. *Proc. 2nd Conf. Equine Infectious Disease*, 178.

78. HESS, W.R., 1971: African swine fever virus. Virol. Monogr. 9, 1.
79. HEUSCHELE, W.P., L. COGGINS and S.S. STONE, 1966: Fluorescent antibody studies on African swine fever. Amer. J. vet. Res. 27, 477.
80. HIRT, B., 1967: Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. J. Mol. Biol. 26, 365.
81. HLOZANEK, I., 1970: The influence of ultraviolet-inactivated Sendai virus on Marek's disease virus infection in tissue culture. J. gen. Virol. 9, 45.
82. HOTCHIN, J., 1971: Persistent and slow virus infections. Monogr. Virol. 3 (Karger, Basel).
83. HOTCHIN, J., 1972: Slow viruses and neurological damage. In: Proc. 3rd Int. Congr. Neurogenetics and Neuroophthalmology, Brussels 1970. Monogr. human Genet. 6, 172.
84. HOTCHIN, J., 1973: Transient virus infection: Spontaneous recovery mechanism of lymphocytic choriomeningitis virus-infected cells. Nature New Biol. 241, 270.
85. ILLAVIA, S.J., and H.E. WEBB, 1972: The effect of encephalitogenic viruses on tissue cultures of non-neuronal cells of mouse and human brain. Neurology 22, 619.
86. JACK, I., 1974: Persistent infections with herpesviruses. Progr. med. Virol. 18, 160.
87. JENTSCH, G., 1974: Züchtung von Zellkulturen aus Leucophaea Maderae F. (Blattaria) und ihre Verwendung zur Vermehrung animaler Virusarten. Biol. Diss., München.
88. JOHNSON, R.H., 1965: Feline panleucopaenia virus. II. Some features of the cytopathic effects in feline kidney monolayers. Res. Vet. Sci. 6, 472.

89. KIMURA, Y., Y. ITO, K. SHIMOKATA, Y. NISHIYAMA, I. NAGATA and J. KITOH, 1975: Temperature-sensitive virus derived from BHK cells persistently infected with HVJ (Sendai virus). *J. Virol.* 15, 55.
90. KLEIN, G., 1972: Herpesviruses and oncogenesis. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 69, 1056.
91. KLEIN, G., L. DOMBOS and B. GOTHOSHAR, 1972: Sensitivity of Epstein-Barr virus (EBV) producer and non-producer human lymphoblastoid cell lines to superinfection with EBV. *Int. J. Cancer* 10, 44.
92. KOBAYASHI, K., 1961: Studies on the cultivation of equine infectious anemia virus in vitro. III. Propagation of the virus in leukocyte culture. *Virus* 11, 249.
93. KOPROWSKI, H., T.J. WIKTOR and M.M. KAPLAN, 1966: Enhancement of rabies virus infection by lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* 28, 754.
94. KUBIN, G., 1962: La culture du virus de la peste porcine en couche monocellulaire. *Bull. Off. Int. Epizoot.* 57, 1395.
95. KUMAGAI, T., T. SHIMIZU and M. MATUMOTO, 1958: Detection of hog cholera virus by its effect on Newcastle disease virus in swine tissue culture. *Science* 128, 366.
96. LARENAUDIE, B., M.C. TOULIER, J. SANTUCCI et R. CARNERO, 1967: Etude en microscopie électronique de l'hémo-adsorption provoquée par le virus de la peste porcine Africaine. *Rec. Méd. vét.* 143, 925.
97. LEE, L.F., 1971: Large-scale production of Marek's disease virus. *Avian Dis.* 15, 565.

98. LEE, L.F., E.D. KIEFF, S.L. BACHENHEIMER, B. ROIZMAN, B.G. SPEAR, B.R. BURMESTER and K. NAZERIAN, 1971: Size and composition of Marek's disease virus deoxyribonucleic acid. *J. Virol.* 7, 289.
99. LEE, L.F., K. NAZERIAN, H.G. PURCHASE and B.R. BURMESTER, 1973: Released and extracted virions of Marek's disease virus. *Avian Dis.* 17, 838.
100. LEHMANN-GRUBE, F., 1967: A carrier state of lymphocytic choriomeningitis virus in L cell cultures. *Nature, Lond.* 213, 770.
101. LEHMANN-GRUBE, F., 1971: Lymphocytic choriomeningitis virus. *Virol. Monogr.* 10.
102. LEHMANN-GRUBE, F., and R. HESSE, 1967: A new method for the titration of lymphocytic choriomeningitis viruses. *Arch. ges. Virusforsch.* 20, 256.
103. LEHMANN-GRUBE, F., W. SLENCZKA and R. TEES, 1969: A persistent and inapparent infection of L cells with the virus of lymphocytic choriomeningitis. *J. gen. Virol.* 5, 63.
104. LEIBOVITZ, A., 1963: A medium for the growth and maintenance of tissue cell cultures in free gas exchange with atmosphere. *Am. J. Hyg.* 78, 173.
105. LENNETTE, E.H., and N.J. SCHMIDT, 1964: Diagnostic procedure for viral and rickettsial diseases, Ed. 3. New York, American Public Health Association.
106. LEWANDOWSKI, L., D. WATERS and H. KOPROWSKI, 1973: In "Proceedings of the Symposium on Negative Strand Viruses" (B. Mahy and R. Barry, eds.) Cambridge, Engld.
107. LIEBKE, H., 1967: Der fluoreszenzserologische Nachweis des Schweinepestvirus über die Gewebekultur bei experimentell infizierten Schweinen. *Zbl. Vet. Med.*, B 14, 57.

108. LOVE, R., M.V. FERNANDES and H. KOPROWSKI, 1964: Cytochemistry of inclusion bodies in tissue culture cells infected with rabies virus. Proc. Soc. exp. Biol., N.Y. 116, 560.
109. LUDWIG, H., 1975: Borna disease. Vortrag anlässlich der offiziellen Eröffnung des WHO-Colaborating-Centre for Collection and Evaluation of Data on Comparative Virology, München, 14. - 17. Okt. 1975.
110. LUDWIG, H., H. BECHT and L. GROH, 1973: Borna disease (BD), a slow virus infection. Biological properties of the virus. Med. Microbiol. Immunol. 158, 1275.
111. MAGUIRE, T., and J.A.R. MILES, 1965: The arbovirus carrier state in tissue cultures. Arch. ges. Virusforsch. 15, 457.
112. MAHNEL, H., und A. MAYR, 1974: Schweinepest. Infektionskrankheiten und ihre Erreger. Eine Sammlung von Monographien 16.
113. MALMQUIST, W.A., 1963: Serologic and immunologic studies with African swine fever virus. Amer. J. vet. Res. 24, 450.
114. MALMQUIST, W.A., and D. HAY, 1960: Hemadsorption and cytopathic effect produced by African swine fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures. Amer. J. vet. Res. 21, 104.
115. MANSI, W., 1957: The study of some viruses by the plate gel diffusion precipitating test. J. Comp. Path. 67, 297.
116. MANSI, W.J., and A. KING, 1963: The study of swine fever by the plate gel diffusion precipitation test. Vet. Rec. 75, 933.

117. MARCUS, P.I., S.J. CIECIURA and T.T. PUCK, 1956: Clonal growth in vitro of epithelial cells from normal human tissues. J. exp. Med. 104, 615.
118. MARGOLIS, G., and L. KILHAM, 1965: Rat virus, an agent with an affinity for the dividing cell. NINDB Monograph No. 2. Slow, latent and temperate virus infections, 361 (US Dept. of Health, Education and Welfare, Wash., D.C. 1965).
119. MARMUR, J., 1961: A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. J. molec. Biol. 3, 208.
120. MARSTON, R.Q., 1958: Cytopathogenic effects of hemadsorption virus Type I. Proc. Soc. exp. Biol., N.Y. 98, 853.
121. MATUMOTO, M., 1966: Multiplication of measles virus in cell cultures. Bact. Rev. 30, 152.
122. MAYOR, H.D., 1964: A labile intranuclear RNA associated with the development of adenoviruses. J. exp. Med. 119, 433.
123. MAYR, A., und K. KALCHER, 1960: Vergleichende Studien über die Züchtung von Geflügelpockenviren in der Zellkultur. Arch. ges. Virusforsch. 10, 72.
124. MAYR, A., und K. DANNER, 1972a: In vitro-Kultivierung von Borna-Virus über Gehirn-Explantate infizierter Tiere. Zbl. Vet. Med., B 19, 785.
125. MAYR, A., and K. DANNER, 1972b: Production of Borna virus in tissue culture. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 140, 511.
126. MAYR, A., and K. DANNER, 1974a: Persistent infections caused by Borna virus. Infection 2, 64.

127. MAYR, A., und K. DANNER, 1974b: Züchtung und Titrierung von Borna-Virus in Zellkulturen aus Organen fötaler Lämmer. Zbl. Vet. Med., B 21, 131.
128. MAYR, A., P.A. BACHMANN, B. BIBRACK und G. WITTMANN, 1974: Virologische Arbeitsmethoden Band I. VEB G. Fischer Verlag, Jena.
129. McALLISTER, R.M., J.E. FILBERT and C.R. GOODHEART, 1967: Human cytomegalovirus. Studies on the mechanism of viral cytopathology and inclusion body formation. Proc. Soc. exp. Biol. N.Y. 124, 932.
130. MCCARTHY, K., C.H. TAYLOR-ROBINSON and S.E. PILLINGER, 1963: Isolation of rubella virus from cases in Britain. Lancet I, 593.
131. MENGELING, W.L., 1968: A fluorescent micro-plaque assay for hog cholera virus. Localization of infection with homologous antiserum. Arch. ges. Virusforsch. 23, 27.
132. MENGELING, W.L., E.C. PIRTLE and J.P. TORREY, 1963: Identification of hog cholera viral antigen by immunofluorescence. Application as a diagnostic and assay method. Canad. J. Comp. Med. Vet. Sci. 27, 249.
133. MENGELING, W.L., and J.P. TORREY, 1967: Evaluation of the fluorescent antibody-cell culture tests for hog cholera diagnosis. Amer. J. Vet. Res. 28, 1653.
134. METTLER, N.E., S.M. BUCKLEY and J. CASALS, 1961: Propagation of Junín virus, the etiological agent of Argentinian hemorrhagic fever, in HeLa cell cultures. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 107, 684.
135. MOCARELLI, P., J. PALMER and V. DEFENDI, 1973: a permanent line of macrophages with normal activity in a primary antibody response in vitro. Immunol. Comm. 2, 441.

136. MOLNÁR, J., 1954: Precipitations experiments with swine fever virus-containing material. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 4, 247.
137. MOULTON, J., and L. COGGINS, 1968: Synthesis and cytopathogenesis of African swine fever virus in porcine cell cultures. *Amer. J. vet. Res.* 29, 219.
138. NAZERIAN, K., and H.G. PURCHASE, 1970: Combined fluorescent-antibody and electron microscopy study of Marek's disease virus-infected cell culture. *J. Virol.* 5, 79.
139. NAZERIAN, K., J.J. SOLOMON, R.L. WITTER and B.R. BURMESTER, 1968: Studies on the etiology of Marek's disease. II. Finding of a herpesvirus in cell culture. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 127, 177.
140. NISHIMURA, Y., U. SATO, T. HANAKI und H. KAWASHIMA, 1962: Untersuchungen über die Gewebekultur des Schweinepestvirus. I. Einfluß des Schweinepestvirus auf das Newcastle disease-Virus. *Jap. J. Vet. Sci.* 24, 29.
141. NONOYAMA, M., and J.S. PAGANO, 1971: Detection of Epstein-Barr viral genome in nonproductive cells. *Nature New. Biol.* 233, 103.
142. NORRBY, E., 1969: Rubella virus. *Virol. Monogr.* 7, 115.
143. OKADA, Y., 1962: Analysis of giant polynuclear cell formation caused by HVJ virus from Ehrlich's ascites tumor cells. I. Microscopic observation of giant polynuclear cell formation. *Exp. Cell. Res.* 26, 98.
144. ORTIN, J., and W. DOERFLER, 1975: Transcription of the genome of adenovirus type 12. I. Viral mRNA in abortively infected and transformed cells. *J. Virol.* 15, 27.

145. PFAU, C.J., I.R. PEDERSEN and M. VOLKERT, 1965: Inability of nucleic acid analogues to inhibit the synthesis of lymphocytic choriomeningitis virus. *Acta path. microbiol. scand.* 63, 181.
146. PLOWRIGHT, W., F. BROWN and J. PARKER, 1966: Evidence for the type of nucleic acid in African swine fever virus. *Arch. Virusforsch.* 19, 289.
147. POPE, J.H., M.K. HOME and E.J. WETTERS, 1969: Significance of a complement-fixing antigen associated with herpes-like virus and detected in the Raji cell line. *Nature, Lond.* 222, 186.
148. PORTER, D.D., H.G. PORTER and B.B. DEERHAKKE, 1969: Immunofluorescence assay for antigen and antibody in lactic dehydrogenase virus infection of mice. *J. Immunol.* 102, 431.
149. PORTER, D.D., and A.E. LARSEN, 1974: Aleutian disease of mink. *Progr. med. Virol.* 18, 32.
150. PRECIOUS, S.W., H.E. WEBB and E.T.W. BOWEN, 1974: Isolation and persistence of Chikungunya virus in cultures of mouse brain cells. *J. gen. Virol.* 23, 271.
151. PROBSTMEYER, F., M. BENYESH-MELNICK and R.M. MCCOMBS, 1967: Comparison of human cytomegalovirus obtained by glycine extraction and by sonic disruption of infected cells. *J. Virol.* 1, 241.
152. PURCHASE, H.G., 1969: Immunofluorescence in the study of Marek's disease. I. Detection of antigen in cell culture and an antigenic comparison of eight isolates. *J. Virol.* 3, 557.
153. PURCHASE, H.G., 1974: Marek's disease virus and the herpesvirus of turkeys. *Progr. med. Virol.* 18, 178.

154. PURCHASE, H.G., B.R. BURMESTER and C.H. CUNNINGHAM, 1971a:
Responses of cell cultures from various avian species
to Marek's disease virus and herpesvirus of turkeys.
Amer. J. vet. Res. 32, 1811.
155. PURCHASE, H.G., B.R. BURMESTER and C.H. CUNNINGHAM, 1971b:
Pathogenicity and antigenicity of clones from strains
of Marek's disease virus and herpesvirus of turkeys.
Inf. Immun. 3, 295.
156. RAPP, F., S.J. SELIGMAN, L.B. JAROSS and I. GORDON, 1959:
Quantitative determination of infectious units of
measles virus by counts of immunofluorescent foci.
Proc. Soc. exp. Biol., N.Y. 101, 289.
157. RAPP, F., and S.M. BUCKLEY, 1962: Studies with the
etiologi cal agent of Argentinian epidemic hemorrhagic
fever (Junfin virus). Amer. J. Path. 40, 63.
158. RAPP, F., L.E. RASMUSSEN and M. BENYESH-MELNICK, 1963:
The immunofluorescent focus technique in studying
the replication of cytomegalovirus. J. Immunol. 91,
709.
159. RAPP, F., and J.L. MELNICK, 1964: Applications of
tissue culture methods in the virus laboratory.
Progr. med. Virol. 6, 268.
160. RESSANG, A.A., en P.H. BOOL, 1966: Varkenspestdiagnostiek
met behulp van de ETV-, END- en de immunofluorescentie-
technieken. Tijdschr. Diergeneesk. 91, 1148.
161. RESSANG, A.A., und J.L. DEN BOER, 1967: Vortrag beim
EWG-Treffen zur Bekämpfung der Schweinepest, Tübingen,
21. - 22. Dez. 1967.
162. RHIM, J.S., L.E. JORDAN and H.D. MAYOR, 1962: Cytochemical,
fluorescent antibody and electron microscopic studies
on the growth of reovirus (ECHO 10) in tissue culture.
Virology 17, 342.

163. RILEY, V., 1968: Lactate dehydrogenase in the normal and malignant state in mice and the influence of a benign enzyme-elevating virus. *Meth. Canc. Res.* 4, 493.
164. ROIZMAN, B., and A.E. SCHLUEDERBERG, 1962: Virus infection of cells in mitosis. III. Cytopathology of mitotic and amitotic Hep-2 cells infected with measles virus. *J. nat. Cancer Inst.* 28, 35.
165. ROSANOFF, E.I., 1961: Hemagglutination and hemadsorption of measles virus. *Proc. Soc. exp. Biol., N.Y.* 106, 563.
166. ROSS, K.B., and R.J. ASH, 1974: Density changes in herpesvirus-infected cells. *Cytobios* 9, 227.
167. RUSTIGIAN, R., 1962: A carrier state in HeLa cells with measles virus (Edmonston strain) apparently associated with noninfectious virus. *Virology* 16, 101-104.
168. RUSTIGIAN, R., 1966: Persistent infection of cells in culture by measles virus. *J. Bacteriol.* 92, 1805.
169. SANCHEZ BOTIJA, C., 1963: La peste suina Africana. *Zooprofilassi* 18, 587.
170. SCHMIDT, M., 1974: Ein Vergleich verschiedener Methoden zur Trennung der zellulären Blutbestandteile bei Schwein und Rind. *Vet. Med. Diss., München.*
171. SCHMIDT, N.J., J. DENNIS and E.H. LENNETTE, 1968: Hemadsorption and hemadsorption inhibition tests for rubella virus. *Arch. ges. Virusforsch.* 25, 308.
172. SCHNEIDER, L.G., 1964: Erfahrungen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern bei der routinemäßigen Laboratoriumsdiagnose der Tollwut. I. Mitteilung: Die fluoreszierende Antikörper-Technik. *Zbl. Vet. Med., B* 11, 207.

173. SCHWÖBEL, W., 1961: Die Bildung von Plaques durch das Virus der Maul- und Klauenseuche unter methylyzellulosehaltigen Medien. Z. Naturforsch. 16, 479.
174. SEAMER, J., 1974: Limited infection of mouse brain cultures with Semliki forest virus. Br. J. exp. Path. 55, 606.
175. SEDWICK, W.D., and T.J. WIKTOR, 1967: Reproducible plaquing system for rabies, lymphocytic choriomeningitis and other ribonucleic acid viruses in BHK-21/13S agarose suspensions. J. Virol. 1, 1224.
176. SELIGMAN, S.J., and F. RAPP, 1959: A variant of measles virus in which giant cell formation appears to be genetically determined. Virology 9, 143-145.
177. SEVER, J.L., 1973: The biology of paramyxoviruses. In: Slow virus diseases, p. 67 (Edit. Zeman, W., and E.H. Lennette).
178. SIGURDARDOTTIR, B., K.F. GIVAN, K.R. ROZEE and A.J. RHODES, 1963: Association of virus with cases of rubella studied in Toronto: Propagation of the agent and transmission to monkeys. Canad. med. Ass. J. 88, 128.
179. SIGURDSSON, B., H. THORMAR and P.A. PÅLSSON, 1960: Cultivation of visna virus in tissue culture. Arch. ges. Virusforsch. 10, 368.
180. SOL, C.J.A., C. WALIG, J. TER SCHEGGET and J. VAN DER NOORDAA, 1975: Analysis of defective SV₄₀ DNA by agarose gel electrophoresis. J. gen. Virol. 28, 285.
181. SOLORZANO, R.F., 1962: An in vitro test for hog cholera. Thesis, Pennsylvania State Univ..

182. SPEAR, P.G., and B. ROIZMAN, 1972: Proteins specified by herpes simplex virus. V. Purification and structural proteins of the herpesvirion. *J. Virol.* 9, 143.
183. SPENDLOVE, R.S., E.H. LENNETTE and A.C. JOHN, 1963: The role of the mitotic apparatus in the intra-cellular location of reovirus antigen. *J. Immunol.* 90, 554.
184. STANWICK, T.L., and J.V. HALLUM, 1974: Role of interferon in six cell lines persistently infected with rubella virus. *Inf. Immun.* 10, 810.
185. STAUBER, E.H., 1971: The pathogenesis of lactate dehydrogenase elevating virus in mice. Thesis, Wash. State Univ..
186. ST. JEOR, S., and F. RAPP, 1973a: Cytomegalovirus replication in cells pretreated with 5-iodo-2'-deoxy-uridine. *J. Virol.* 11, 986.
187. ST. JEOR, S., and F. RAPP, 1973b: Cytomegalovirus: Conversion of nonpermissive cells to a permissive state for virus replication. *Science* 181, 1060.
188. STONE, S.S., and W.R. HESS, 1965: Separation of virus and soluble noninfectious antigens in African swine fever virus by isoelectric precipitation. *Virology*, 26, 622.
189. SUGAMURA, K., H. TOZAWA, M. HOMMA and N. ISHIDA, 1974: Factors influencing the establishment of persistent infection of HVJ (Sendai virus) in L cells. *Japan. J. Microbiol.* 18, 349.
190. TER MEULEN, V., H. KOPROWSKI, Y. IWASAKI, Y.M. KACKELL and D. MULLER, 1972a: Fusion of cultured multiple sclerosis brain cells with indicator cells: presence of nucleocapsids and virions and isolation of para-influenza type virus. *Lancet* II, 1.

191. TER MEULEN, V., P.H. BARTELS, G.F. BAHR, M. BIBBO, N. CREMER, E.H. LENNETTE and G.L. WIED, 1972b: Computer assisted analysis of a carrier culture infected with Moloney leukemia virus. *Acta Cytol.* 16, 454.
192. THORMAR, H., 1960: Stability of visna virus in infectious tissue culture fluid. *Arch. ges. Virusforsch.* 10, 501.
193. THORMAR, H., 1969: Visna and maedi virus antigen in infected cell cultures studied by the fluorescent antibody technique. *Acta path. microbiol. scand.* 75, 296.
194. THORMAR, H., F.H. LIN and R.S. TROWBRIDGE, 1974: Visna and maedi viruses in tissue culture. *Progr. med. Virol.* 18, 323.
195. TORLONE, V., F. TITOLI, L. GIALLETTI e E.L. CASTRO-PORTUGAL, 1968: Impiego della immunofluorescenza per la titolazione degli anticorpi neutralizzanti del virus della pesta suina classica. *Arch. Vet. Ital.* 19, 81.
196. USHIMI, C., J.B. HENSON and J.R. GORHAM, 1972: Immunofluorescent study of the one-step growth curve of equine infectious anemia virus. *Infect. Immun.* 5, 890.
197. VERONELLI, J.A., H.F. MAASSAB and A.V. HENNESSY, 1962: Isolation in tissue culture of an interfering agent from patients with rubella. *Proc. Soc. exp. Biol., N.Y.* 111, 472.
198. VIGÁRIO, J.D., M.E. RELVAS, F.P. FERRAZ, J.M. RIBEIRO and C.G. PEREIRA, 1967: Identification and localization of genetic material of African swine fever virus by autoradiography. *Virology* 33, 173.

199. VOGEL, J., and A. SHELOKOV, 1957: Adsorption-hem-agglutination test for influenza virus in monkey kidney tissue culture. *Science* 126, 358.
200. WADSWORTH, C., 1957: A slide technique for the analysis of immune precipitates in gel. *Int. Arch. Allergy* 10, 355.
201. WALKER, D.L., 1964: The viral carrier state in animal cell cultures. *Progr. med. Virol.* 6, 111.
202. WALKER, D.L., and H.C. HINZE, 1962a: A carrier state of mumps virus in human conjunctiva cells. I. General characteristics. *J. exp. Med.* 116, 739.
203. WALKER, D.L., and H.C. HINZE, 1962b: A carrier state of mumps virus in human conjunctiva cells. II. Observations on intercellular transfer of virus and virus release. *J. exp. Med.* 116, 751.
204. WATERS, D.J., H. KOPROWSKI and L.J. LEWANDOWSKI, 1974: Parainfluenza 1 virus and multiple sclerosis: the conversion of 6/94 virus released from human brain cells and other mammalian cells into an infectious form by passage in macrophages. *Med. Microbiol. Immunol.* 160, 235.
205. WEBB, H.E., S.J. ILLAVIA and G.D. LAURENCE, 1971: Measles-vaccine viruses in tissue culture of non-neuronal cells of human foetal brain. *Lancet* II, 4.
206. WEBER, K., and M. OSBORN, 1969: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406.
207. WEBSTER, J.M., and B.E. KIRK, 1974: Immunofluorescent cell-counting assay for lymphocytic choriomeningitis virus. *Appl. Microbiol.* 28, 17.

208. WELLER, T.H., and A.H. COONS, 1954: Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro. Proc. Soc. exp. Biol., N.Y. 86, 789.
209. WELLER, T.H., and F.A. NEVA, 1962: Propagation in tissue culture of cytopathic agents from patients with rubella-like illness. Proc. Soc. exp. Biol., N.Y. 111, 215.
210. WIKTOR, T.J., and H. KOPROWSKI, 1966: Propagation of rabies virus in tissue culture. In Laboratory techniques in rabies, 2nd ed. W.H.O. Monograph Series, no. 23, p. 173.
211. WIKTOR, T.J., M.M. KAPLAN and H. KOPROWSKI, 1966: Rabies and lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV). Infection of tissue culture; enhancing effect of LCMV. Ann. Med. intern. Fenn. 44, 290.
212. WIKTOR, T.J., E. KUWERT and H. KOPROWSKI, 1968: Immune lysis of rabies virus-infected cells. J. Immunol. 101, 1271.
213. WIKTOR, T.J., and H.F. CLARK, 1972: Chronic rabies virus infection of cell cultures. Infect. Immun. 6, 988.
214. WOODS, W., R.T. JOHNSON, D.D. HOSTETLER, M.L. LEPOW and F.C. ROBBINS, 1966: Immunofluorescent studies on rubella infected tissue cultures and human tissues. J. Immunol. 96, 253.
215. YAMAMOTO, K., T. MATSUO and T. OSATO, 1975: Differential activation by cell fusion of Epstein-Barr viral and type-C viral genomes in non-productive human lymphoid cells. Arch. Virol. 48, 187.
216. ZEMAN, W., and E.H. LENNETTE, 1973: Slow virus diseases. (Williams & Wilkins Comp.), Baltimore, 1974.

Herrn Prof. Dr. Dr.h.c. A. Mayr danke ich für
die freundliche Überlassung des Arbeitsthemas.

Bei Herrn Dr. K. Danner bedanke ich mich für
wertvolle Hinweise und hilfreiche Unterstützung.

LEBENS LAUF

Am 9. April 1949 wurde ich, Dieter Heubeck, als Sohn des Industriekaufmanns Johann Andreas Heubeck und seiner Ehefrau Grete, geb. Ott, in Erlangen geboren.

Nach 4 Jahren Grundschule (1955-1959) in Baiersdorf/Mfr. und Erlangen besuchte ich das Ohm-Gymnasium in Erlangen, an dem ich im Juli 1968 die Reifeprüfung ablegte.

Vom Wintersemester 1968/69 bis zu meinem Staatsexamen im Sommer 1973 studierte ich an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München Tiermedizin.

Am 23. November 1973 erhielt ich meine Bestallung als Tierarzt.

